

# Molekulare Mechanismen TNF-vermittelter viraler Hepatitis

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Marianne Katharina Janas**

aus

Siegburg

Bonn 2015



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Percy A. Knolle
2. Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 8. April 2016

Erscheinungsjahr: 2016

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 6 der Promotionsordnung vom 03.06.2011 im Zeitraum von Oktober 2010 bis September 2015 von Herrn Prof. Dr. Knolle betreut.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass

- die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde,
- die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind,
- die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind,
- kein früherer Promotionsversuch unternommen worden ist,
- für die inhaltlich-materielle Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen wurde sowie keinerlei Dritte vom Doktoranden unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Tätigkeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Bonn, den 10.09.2015



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>I. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1. Virale Hepatitis.....	3
2. Immunabwehr gegen virale Infektionen der Leber .....	3
2.1. Die Erkennung des Virus .....	4
2.2. Antivirale Effektorfunktionen zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) .....	6
3. Formen des Zelltods.....	7
3.1. Apoptose.....	8
4. Mitochondrien .....	12
4.1. Die Rolle von Mitochondrien im Zelltod.....	13
4.2. Die Rolle von Mitochondrien im Energiemetabolismus.....	18
5. TNF als Vermittler von Zelltod und Entzündung .....	19
5.1. TNFR-Signaltransduktion .....	20
<b>II. Ziele der Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>III. Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
1. Material .....	25
1.1. Geräte.....	25
1.2. Verbrauchsmaterialien.....	27
1.3. Chemikalien und Reagentien.....	28
1.4. Puffer und Medien.....	31
1.5. Kit-Systeme .....	35
1.6. Antikörper .....	35
1.7. Primer.....	38
1.8. Enzyme.....	38
1.9. Zytokine und andere rekombinante Proteine.....	38
1.10. Mauslinien .....	39
1.11. Zelllinien.....	39
1.12. Viren.....	40
1.14. Computersoftware .....	41
2. Methoden.....	42
2.1. Tiermodell der TNF-vermittelten viralen Hepatitis.....	42
2.2. Virale Infektion.....	42
2.3. <i>In-vivo</i> -Biolumineszenzmessung.....	42
2.4. Injektionen .....	43
2.5. Adenovirusproduktion und Titration.....	44
2.6. Blutentnahme und Ermittlung der ALT- und AST-Aktivitäten.....	46

## Inhaltsverzeichnis

2.7. Leberentnahme .....	46
2.8. Quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	46
2.9. XBP1-Spleißing-Assay .....	48
2.10. Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	48
2.11. Immunoblot .....	49
2.12. Bestimmung der Caspasen-Aktivität .....	51
2.13. Bestimmung von ROS/RNS .....	51
2.14. Histologie .....	51
2.15. Isolation von Maus-Lebermitochondrien .....	53
2.16. Funktionale Analysen isolierter Mitochondrien.....	53
2.17. Statistik .....	57
<b>IV. Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
1. Eine virale Infektion der Leber führt zur Sensibilisierung für TNFR1-induzierte Leberschädigung.....	58
1.1. Die TNF-induzierte virale Hepatitis kann durch unterschiedliche Viren hervorgerufen werden. ....	60
1.2. Der TNF-induzierte Zelltod infizierter Hepatozyten wird über den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) vermittelt.....	61
2. Die virale Infektion bestimmt eine differentielle Einleitung der TNFR1-abhängigen Signalwege. ....	62
2.1. TNF führt selektiv in infizierten Hepatozyten zur Induktion von Apoptose.....	63
2.2. TNF initiiert antiapoptotische / proinflammatorische Signaltransduktion in uninfizierten und ebenso in infizierten Hepatozyten.....	65
2.3. Der Zeitverlauf der TNFR1-Signaltransduktion in uninfizierten und infizierten Mäusen ist gleich. ....	67
2.4. Verschiedene TNFR1-Signaltransduktionswege laufen parallel in einer Zelle ab. ....	69
3. Die Sensibilisierung für TNF-vermittelte Apoptose nach viraler Infektion basiert nicht auf einer Reduktion von antiapoptotischen Schlüsselproteinen. ....	70
4. Hepatozyten reagieren mit der Induktion von Stress-Antworten auf eine virale Infektion. ....	74
4.1. Die Sensibilisierung für TNF-vermittelten Zelltod ist unabhängig von klassischen innate Immunrezeptoren. ....	74
4.2. Die virale Infektion geht mit der Induktion zellulären Stresses einher. ....	76
4.3. Die virale Infektion führt zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie.....	79
5. Die virale Infektion wirkt sich auf apoptotische Funktionen von Mitochondrien aus.....	80
5.1. Die virale Infektion beeinflusst die Morphologie von Mitochondrien. ....	80
5.2. Mitochondrien infizierter Lebern zeigen veränderte respiratorische Parameter. ....	83
5.3. Mitochondriale ROS haben keinen Einfluss auf die TNF-vermittelte virale Hepatitis. ....	86
5.4. Die Mitochondrien infizierter Lebern zeigen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Bid und Calcium. ....	87

5.5. Die mitochondrialen Veränderungen durch Infektion sind nicht abhängig von Steady State-TNFR-Signalen.....	90
6. Ein pharmakologischer Eingriff in Calcium-Signale oder die mitochondriale Permeabilitäts-Transition kann die TNF-vermittelte virale Hepatitis reduzieren. ....	92
<b>V. Diskussion.....</b>	<b>94</b>
1. Die virale Infektion sensibilisiert Hepatozyten für TNFR1-vermittelte Apoptose trotz gleichzeitig erhaltener antiapoptotischer NFκB- Signaltransduktion. ....	95
2. Die virale Infektion begünstigt die Aktivierung der Initiator-Caspase 8 wahrscheinlich in TNFR1-Komplex IIb. ....	97
3. Die zellintrinsische Detektion der viralen Infektion erfolgt vermutlich unabhängig von klassischen innate Immunrezeptoren, sondern über zellulären Stress. ....	100
4. Mitochondrien: Der Schnittpunkt zwischen TNF-induzierter Apoptose und der Detektion viraler Infektionen.....	106
5. Bedeutung der TNF-vermittelten Eliminierung infizierter Hepatozyten für die Pathogenese viraler Hepatitiden. ....	112
6. Die TNF-vermittelte virale Hepatitis als experimentelles Modell für immunvermittelte Leberschädigung .....	115
<b>VI. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>VII. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>135</b>
<b>VIII. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>137</b>
<b>IX. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>138</b>
<b>X. Vorveröffentlichungen .....</b>	<b>144</b>



## Zusammenfassung

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) eliminieren selektiv Virus-infizierte Zellen, indem sie sie anhand von viralem Antigen erkennen, das auf deren Oberfläche präsentiert wird. Eine Ausnahme bildet eine kürzlich entdeckte nicht-kanonische CTL-Effektorfunktion, die ohne direkte Antigenpräsentation eine selektive Tötung infizierter Zellen erreicht. Hierbei sekretieren CTL Tumornekrosefaktor (TNF), welcher nur in infizierten Hepatozyten apoptotischen Zelltod hervorruft, während uninfizierte Zellen überleben. In dieser Arbeit wurden die molekularen Grundlagen dieser selektiven Tötung Virus-infizierter Hepatozyten durch TNF an einem in-vivo-Mausmodell adenoviraler Leberinfektion untersucht.

Die Sensibilisierung von Hepatozyten für TNF-vermittelte Apoptose war unabhängig von klassischer innater Immunerkennung des Virus durch Struktur-erkennungs-Rezeptoren. Vielmehr rief die Infektion zelluläre Stress-Antworten hervor, die als Auslöser von mitochondrialer Dysfunktion bekannt sind. Tatsächlich wirkte sich die Infektion auf Mitochondrien aus, welche durch ihre Permeabilisierung und die Ausschüttung proapoptotischer Faktoren essentiell an der Apoptose in Hepatozyten beteiligt sind: Mitochondrien infizierter Lebern zeigten eine verstärkte Permeabilisierung nach apoptotischer Stimulation.

Außerdem führte die virale Infektion zu einer drastischen Veränderung in der proximalen TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) – Signaltransduktion: Während TNF in uninfizierten Hepatozyten den protektiven NF $\kappa$ B -Signalweg aktivierte, wurde nur in infizierten Zellen zusätzlich die Aktivierung der Initiator-Caspase 8 und somit die Induktion des apoptotischen TNFR1-Signalwegs induziert, der in Hepatozyten eine mitochondriale Amplifikation benötigt.

Demnach greift die virale Infektion durch zwei Mechanismen in die zelluläre Apoptose-Regulation ein, die in der Schädigung von Mitochondrien konvergieren. Mitochondrien stellen somit die zentrale Kontrollinstanz eines Zwei-Treffer-Systems in der TNF-vermittelten hepatozellulären Apoptose dar.

Die TNF-vermittelte Tötung virusinfizierter Hepatozyten beruht also auf einem neuen Prinzip Zell-intrinsischer Immunkontrolle, was zytotoxischen T-Lymphozyten helfen kann, Immunevasionsmechanismen von Viren zu umgehen.

## Abstract

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) selectively eliminate virus-infected cells as they recognize viral antigen presented on their cell surface. However, an exception is made by a recently discovered non-canonical effector function of CTL in the liver that selectively kills virus-infected cells independent of direct antigen presentation by the target cell: CTL secrete tumor necrosis factor (TNF), which induces apoptotic cell death in infected hepatocytes, while uninfected cells survive. In this doctoral thesis the molecular basis for the selective killing of virally infected hepatocytes by TNF was investigated in an *in vivo* mouse model of adenoviral liver infection.

The sensitization of hepatocytes towards TNF-mediated cell death was independent of classical innate immune sensing of the virus by pattern recognition receptors. Instead, viral infection triggered cellular stress responses, which are known to induce mitochondrial dysfunction. Indeed, infection with adenovirus affected mitochondria, which are essentially involved in hepatocyte apoptosis by their permeabilization and the subsequent release of proapoptotic mediators: Mitochondria of infected livers showed an increased sensitivity for permeabilization in response to pro-apoptotic stimuli.

Furthermore, viral infection fundamentally modified the proximal TNF receptor 1 (TNFR1)-signal transduction: TNF activated the protective NF $\kappa$ B signaling pathway in uninfected as well as in infected hepatocytes. However, exclusively in infected cells TNF activated initiator caspase 8 thereby inducing the pro-apoptotic TNFR1 signaling pathway, which requires an amplification by the mitochondria in hepatocytes.

Taken together these findings show that viral infection affects the cellular regulation of apoptosis by two mechanisms that converge in damage to the mitochondria. Mitochondria are hence the central control body of a two-hit system in the TNF-induced apoptosis of hepatocytes.

The TNF-induced killing of virus-infected hepatocytes is therefore based on a new principle of cell intrinsic immune control, which helps cytotoxic T lymphocytes to circumvent immune evasion by viruses.

# **I. Einleitung**

## **1. Virale Hepatitis**

Die Hauptfunktionen der Leber sind der Metabolismus, die Produktion von Proteinen und die Entgiftung von toxischen Abfallprodukten. Die Leber wird zu einem großen Teil über die Pfortader durch Blut vom Gastrointestinaltrakt gespeist, das reich an Nährstoffen und Antigenen ist. So gehört auch die Beseitigung von Antigenen aus dem Blut zu den Aufgaben der Leber. Dabei muss sie einerseits die Elimination von pathogenen Mikroorganismen und andererseits tolerogene Reaktionen auf harmlose Nahrungsantigene gewährleisten (Knolle and Thimme, 2014). Diese Balance zwischen Aktivierung und Toleranz bedarf einer strikt regulierten, lokalen Immunität in der Leber (Knolle and Gerken, 2000).

Das tolerogene Milieu in der Leber bedingt jedoch ihre Anfälligkeit gegenüber gut angepassten Pathogenen (Crispe, 2009; Protzer et al., 2012). Dazu zählen hepatotrope Viren, wie die Hepatitis B und C Viren (HBV und HCV), die eine akute Leberentzündung (Hepatitis), aber auch persistierende Infektionen verursachen können. Letztere können chronische Hepatitis, Leberzirrhose und Leberkrebs hervorrufen (Herzer et al., 2007).

Virale Hepatitiden sind durch den Zelltod von Hepatozyten, den Leberparenchymzellen, geprägt. HBV und HCV sind jedoch nicht-zytopathische Viren und somit nicht unmittelbar für den Zelltod von infizierten Hepatozyten verantwortlich (Herzer et al., 2007). Stattdessen werden die Leberschädigung und der Krankheitsverlauf viraler Hepatitiden durch die antivirale Immunantwort bestimmt.

## **2. Immunabwehr gegen virale Infektionen der Leber**

Als erste Instanz in einer Immunantwort greifen zunächst angeborene (innate) Mechanismen, die Viren unspezifisch erkennen und schnell eliminieren können. Später setzt das adaptive Immunsystem ein, das Viren anhand von als Antigenen

## I. Einleitung

bezeichneten Molekülen hochspezifisch als „fremd“ erkennt und darauf angepasste, spezifische Reaktionen einleitet (Guidotti and Chisari, 2006; Rehmann, 2013).

### 2.1. Die Erkennung des Virus

Durch die Erkennung viraler Produkte in infizierten Zellen werden frühe innate Abwehrmechanismen in Gang gesetzt, die eine Ausbreitung des Virus unterbinden sollen. Diese Abwehrmechanismen umfassen die Induktion von Zelltod zur Beseitigung der infizierten Zelle mitsamt des Virus, die Produktion antiviraler Zytokine (lokal wirksame, extrazelluläre Botenstoffe) zur nicht-zytopathischen Hemmung der viralen Replikation oder die Induktion von Effektorfunktionen der Zellen des innate Immunsystems (Guidotti and Chisari, 2006).

Für ihre Replikation gebrauchen Viren zelluläre Maschinerien und Ressourcen (He, 2006). Dabei kommt es in den Wirtszellen zu einer massiven Anreicherung von viralen Produkten wie Proteinen, Nukleinsäuren und viralen Partikeln, was die zelluläre Homöostase stört. Die Zellen reagieren darauf mit der Einleitung von Stress-Antworten, die auf eine Wiederherstellung der Homöostase abzielen. Wenn dies allerdings nicht möglich ist, mündet Stress in der Induktion von Zelltod (Galluzzi et al., 2014). Auf diese Weise können Viren direkt den Zelltod der infizierten Zelle hervorrufen (Everett and McFadden, 1999).

Viren können jedoch auch anhand von hochkonservierten viralen Strukturen erkannt werden, die als Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMP<sup>1</sup>) bezeichnet werden. Zu diesen PAMP gehören beispielsweise (Glyko-) Proteine auf der Virusoberfläche und virale Nukleinsäuren, die zytosolisch vorliegen. Diese PAMP werden von den sogenannten Strukturerkennungsrezeptoren (PRR<sup>2</sup>), innate Immunrezeptoren, detektiert. Die PRR können in membran-gebundene Toll-like-Rezeptoren (TLR) und zytosolische Nukleinsäure-Sensoren unterteilt werden (Thompson et al., 2011).

---

<sup>1</sup> engl.: pathogen associated molecular pattern

<sup>2</sup> engl.: pattern recognition receptor



TLR werden vorrangig von Immunzellen (Wu and Chen, 2014), aber auch von Hepatozyten exprimiert. Sie sind in der Plasma- oder endosomalen Membran lokalisiert und können so extrazelluläre und endozytierte virale Produkte erkennen (Broering et al., 2011; Iwasaki, 2012).

Die zytosolischen Nukleinsäure-Sensoren hingegen werden von fast allen Zelltypen exprimiert. Zu ihnen gehören die RIG-I<sup>3</sup>-like-Rezeptoren, wie RIG-I und MDA5<sup>4</sup>, welche virale RNA erkennen. Virale DNA wird von den Nukleinsäure-Sensoren STING<sup>5</sup> und NLRP3<sup>6</sup> detektiert (Thompson et al., 2011; Wu and Chen, 2014).

Die Stimulation von Strukturerkennungsrezeptoren führt im Wesentlichen zur Aktivierung von drei verschiedenen Signalwegen: (1) Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB<sup>7</sup>, welcher zur Induktion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF und Interleukin-6 (IL-6) führt (Broering et al., 2011). (2) Die Produktion und Sezernierung von Typ-I Interferonen (IFNα und β), welche über den IFNα-Rezeptor (IFNAR) gebunden werden und durch die Transkription IFN-stimulierter Gene einen antiviralen Status der Zelle auslösen (Schneider et al., 2014). (3) Die Aktivierung des Inflammasoms, eines Multiproteinkomplexes, in dem die Protease Caspase 1 aktiviert wird. Diese ermöglicht wiederum die Reifung der inflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-18 (Wu and Chen, 2014).

Insgesamt hat die Stimulation von Strukturerkennungsrezeptoren (PRR) also antivirale, inflammatorische und auch immunstimulatorische Auswirkungen.

Denn durch PRR-Stimulation und Produktion inflammatorischer Zytokine werden Zellen des innate Immunsystems aktiviert und rekrutiert. Dazu gehören auch Antigen-präsentierende Zellen (APC<sup>8</sup>), deren Aktivierung durch PRR-Stimulation benötigt wird, um eine adaptive Immunantwort in Gang zu setzen. Dabei präsentieren die APC Antigene über MHC<sup>9</sup> I und II Moleküle an Zellen des adaptiven Immunsystems, um diese zu aktivieren.

---

<sup>3</sup> engl.: retinoic acid inducible gene I

<sup>4</sup> engl.: melanoma differentiation antigen 5

<sup>5</sup> engl.: stimulator of interferon genes

<sup>6</sup> engl.: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3

<sup>7</sup> engl.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

<sup>8</sup> engl.: antigen presenting cell

<sup>9</sup> engl.: major histocompatibility complex

## **2.2. Antivirale Effektorfunktionen zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL)**

Die zentrale Funktion in der Eliminierung hepatotroper Viren haben virusspezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL<sup>10</sup>), CD8-positive T-Zellen des adaptiven Immunsystems. Sie können durch verschiedene Effektorfunktionen zur Bekämpfung der Viren beitragen, wobei man nicht-zytolytische Effektorfunktionen, bei denen das Virus aus der lebenden Zielzelle eliminiert wird, von zytotoxischen Effektorfunktionen, bei denen die infizierte Zielzelle getötet wird, unterscheidet. Durch die Tötung infizierter Zellen im Rahmen ihrer zytotoxischen Effektorfunktionen bestimmen die CTL weitestgehend das Maß der Leberschädigung und den Krankheitsverlauf der viralen Hepatitis (Knolle and Thimme, 2014; Rehermann, 2013).

Die nicht-zytolytische Bekämpfung von Viren durch CTL erfolgt durch die Produktion von Zytokinen, wie IFN- $\gamma$ , welche die Replikation des Virus in den Hepatozyten hemmen (Gilles et al., 1992; Guidotti and Chisari, 2001; Guidotti et al., 1996). Zusätzlich können diese inflammatorischen Zytokine wiederum die Rekrutierung und Aktivierung von anderen Immunzellen wie Neutrophilen, Makrophagen, Dendritischen Zellen und NK<sup>11</sup>-Zellen bewirken und so sekundär zu einer Verstärkung der Leberschädigung beitragen (Guidotti and Chisari, 2006; Kakimi et al., 2001).

Zu den zytotoxischen Effektorfunktionen der CTL gehört die Einleitung von Todessignalen in der infizierten Zelle durch eine Interaktion von Fas Ligand (FasL), welches auf der Oberfläche der CTL exprimiert wird, mit dem Todesrezeptor Fas auf der infizierten Zelle (Chavez-Galan et al., 2009; Lowin et al., 1994b). Dabei kann die Fas-Expression auf den Zielzellen durch IFN- $\gamma$  sogar gesteigert werden (Andersen et al., 2006), sodass die verschiedenen CTL-Effektorfunktionen auch ineinandergreifen.

Eine weitere zytotoxische CTL-Effektorfunktion ist die Ausschüttung von Perforin- und Granzym-enthaltenden Granula. Diese Effektormoleküle werden von der Zielzelle aufgenommen und können eine Induktion von Caspase<sup>12</sup>-

---

<sup>10</sup> engl.: cytotoxic T cell

<sup>11</sup> engl.: natural killer

<sup>12</sup> engl.: cysteinyl aspartic acid protease

abhängigem und -unabhängigem Zelltod in den Zielzellen bewirken (Chavez-Galan et al., 2009; Lowin et al., 1994a).

Um jedoch eine zielgerichtete, spezifische Zytotoxizität zu gewährleisten, erfordern die bisher genannten zytotoxischen Effektorfunktionen einen direkten Zellkontakt der CTL mit der infizierten Zielzelle. Dabei wird virales Antigen - präsentiert auf MHC I-Molekülen - durch den T-Zell-Rezeptor (TCR<sup>13</sup>) erkannt (Bossi et al., 2002).

Daneben existiert aber auch eine nicht-kanonische zytotoxische Effektorfunktion von CTL in experimenteller viraler Hepatitis, die unabhängig vom Kontakt und direkter Antigenpräsentation der Zielzelle ist. Stattdessen erfolgt die Aktivierung der CTL mittels Kreuzpräsentation von Antigenen infizierter Hepatozyten durch sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSEC<sup>14</sup>). Trotzdem erreicht dieser Mechanismus eine Spezifität für infizierte Zielzellen: Die CTL schütten große Mengen an des Zytokins Tumornekrosefaktor (TNF) aus, welches selektiv in infizierten Hepatozyten Zelltod induziert, während die uninfizierten Zellen geschützt sind. Dieser nicht-kanonische Mechanismus steuert 40% zu der zytotoxischen CTL-Effektorfunktion bei (Wohlleber et al., 2012).

### 3. Formen des Zelltods

Man unterscheidet die Formen des Zelltods, die reguliert stattfinden, von einem Zelltod, der durch unkontrollierte Zerstörung der Zelle auftritt. Der regulierte Zelltod (RCD<sup>15</sup>) involviert einen zellulären, molekularen Apparat. Im Gegensatz dazu wird der unkontrollierte Zelltod (ACD<sup>16</sup>) exogen durch massive physikalische, chemische oder mechanische Stimuli bewirkt (Galluzzi et al., 2015).

Ursprünglich hat man diese zwei Formen des Zelltods durch ihre morphologischen Manifestationen unterschieden. So wurde der RCD durch das morphologische Bild der Apoptose charakterisiert, zu dem die Kondensation der DNA (Pyknosis), die Fragmentierung des Nukleus (Karyorhexis), die Abschnürung von Plasmamembranvesikeln und ihre Aufnahme durch Phagozyten gehört. Der ACD

---

<sup>13</sup> engl.: T cell receptor

<sup>14</sup> engl.: liver sinusoidal endothelial cell

<sup>15</sup> engl.: regulated cell death

<sup>16</sup> engl.: accidental cell death

## I. Einleitung

hingegen wurde durch das morphologische Erscheinungsbild der Nekrose beschrieben, die durch das Anschwellen der Zelle (Oncosis), den Verlust der Plasmamembran-Integrität und der Ausschüttung zellulären Inhalts geprägt ist (Galluzzi et al., 2007; Kerr et al., 1972; Taylor et al., 2008).

Heutzutage stützt man sich bei der Klassifikation von Zelltodformen auf molekulare Parameter (Galluzzi et al., 2012b), da es viele verschiedene Mechanismen mit Überschneidungen zwischen den morphologischen Ausprägungen gibt und es durch Manipulation zum Übergang einer Zelltodform in eine andere kommen kann (Galluzzi et al., 2015).

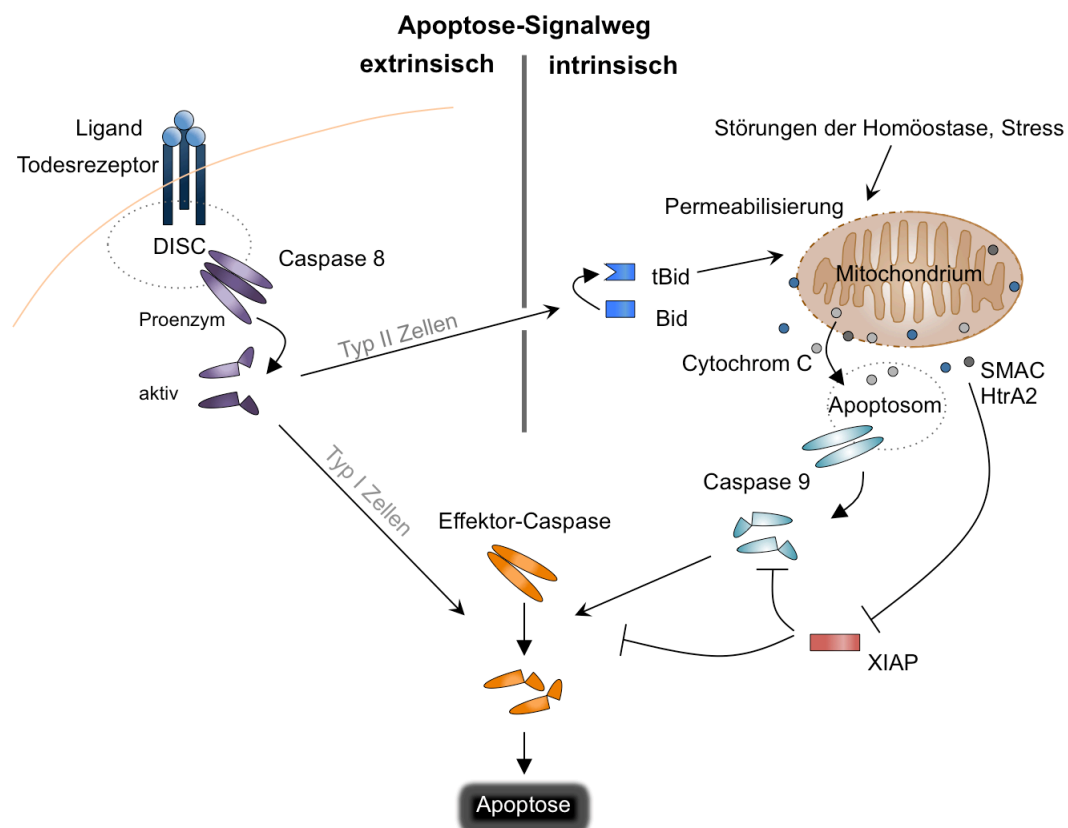
Die nach biochemischer Klassifikation geläufigste Form des regulierten Zelltods ist die Apoptose, die auch dem morphologischen Erscheinungsbild „Apoptose“ entspricht. Im Gegensatz dazu geht die regulierte Nekrose mit dem morphologischen Bild der Nekrose oder einer Mischform einher (Galluzzi et al., 2015). Hinsichtlich ihrer molekularen Maschinerie ist die regulierte Nekrose mannigfaltig (Vanden Berghe et al., 2014). So gehört zu ihr unter anderem die mitochondriale Permeabilitäts-Transition (mPT)-vermittelte regulierte Nekrose, die mit einer bioenergetischen Krise in Folge der Permeabilisierung von Mitochondrien verbunden ist (Nakagawa et al., 2005), die Pyroptose, die durch eine Aktivierung inflammatorischer Caspasen im Inflammasom getriggert wird (Lamkanfi and Dixit, 2014), und die bekannteste Form der regulierten Nekrose, die Nekroptose. Die Nekroptose wird durch einen als Nekrosom bezeichneten Proteinkomplex initiiert, der sich nur unter gewissen Bedingungen nach der Stimulation von Todesrezeptoren bildet (Chan et al., 2015).

### 3.1. Apoptose

Die Ausführung der Apoptose wird durch Enzyme der Caspasen-Familie katalysiert. Caspasen (englisch: **c**ysteiny **a**spartat -specific **protease**) sind Cystein-Proteasen, die nach bestimmten Aspartyl-Resten innerhalb von Proteinen schneiden. Sie werden als Proenzyme produziert und durch Spaltung aktiviert (Stennicke and Salvesen, 1998). Procaspasen können entweder nach Rekrutierung an Adaptermoleküle autokatalytisch aktiviert werden (Shi, 2004) oder durch andere Caspasen gespalten und somit transaktiviert werden. Dadurch ergibt sich eine Caspasen-Kaskade, in der auf die Rekrutierungsaktivie-

Die Aktivierung von Initiator-Caspasen führt zur Transaktivierung von Effektor-Caspasen (Nicholson, 1999).

Bei der Aktivierung der Initiator-Caspasen, das sind die Caspasen 8, 10 und 9, unterscheidet man zwischen dem extrinsischen Apoptose-Weg, der durch externe Stimulation von Todesrezeptoren ausgelöst wird, und dem intrinsischen Apoptose-Weg, der durch intrazelluläre Signale unter mitochondrialer Beteiligung eingeleitet wird (**Abbildung I**). Beide Signalwege münden schließlich in die Spaltung und Aktivierung der Effektor-Caspasen und somit in die Ausführung des apoptotischen Zelltods.



**Abbildung I: Schematische Darstellung der Apoptose-Signalwege.**

Nach ihrer Aktivierung durch die Initiator-Caspasen spalten die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 Schlüsselproteine für die zelluläre Homöostase und das Überleben, wie Strukturproteine, Signalproteine und DNA-Reparaturproteine (Luthi and Martin, 2007; Nicholson and Thornberry, 1997). Dazu gehört auch die

## I. Einleitung

Polymerase PARP<sup>17</sup>, deren Spaltung häufig als Indikator für Caspasen-Aktivität nachgewiesen wird (Wang et al., 2008).

Letztendlich bewirken Caspasen so den Rückbau von zellulären Strukturen und Organellen zu apoptotischen Vesikeln. Diese Vesikel werden schließlich durch Phagozytose entsorgt, indem entsprechende Signale, wie Phosphatidylserin, auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen bzw. Vesikel dargeboten werden (Taylor et al., 2008).

### **3.1.1. Extrinsic Apoptose-Signalweg**

Der extrinsische Apoptose-Signalweg, einer der Signalwege zur Aktivierung von Initiator-Caspasen, ist unter anderem wichtig für die Homöostase und Effektorfunktionen des Immunsystems (Andersen et al., 2006; Jackson et al., 1999).

Er wird durch extrazelluläre zytotoxische Signale eingeleitet, die über die Aktivierung von Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche wirken (**Abbildung I**). Diese Rezeptoren gehören zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie und zeichnen sich durch eine konservierte zytoplasmatische Protein-Domäne, die Todesdomäne (DD<sup>18</sup>), aus (Ashkenazi and Dixit, 1998; Tartaglia et al., 1993). Zu den Todesrezeptoren gehören beispielsweise Fas, Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1), Death Receptor 3 und TRAIL<sup>19</sup>-Rezeptor 1/2. Ihre Liganden sind Zytokine der TNF-Proteinfamilie, wie FasL, TNF, TWEAK<sup>20</sup>, TL1A<sup>21</sup> und TRAIL. Durch die Bindung eines solchen trimeren Liganden kommt es an der DD des trimerisierten Todesrezeptors zur Rekrutierung der DD enthaltenden Adaptermoleküle FADD<sup>22</sup> bzw. TRADD<sup>23</sup> (Wilson et al., 2009). Diese dienen daraufhin als Plattform zur Bildung eines Multiproteinkomplexes (Rezeptorkomplex), der sich je nach zellulärem Kontext und nach Todesrezeptor in seiner Zusammensetzung unterscheiden kann. Im proapoptotischen Rezeptorkomplex,

---

<sup>17</sup> engl.: poly (ADP-ribose) polymerase

<sup>18</sup> engl.: death domain

<sup>19</sup> engl.: TNF-related apoptosis-inducing ligand

<sup>20</sup> engl.: TNF-like weak inducer of apoptosis

<sup>21</sup> engl.: TNF-like ligand 1A

<sup>22</sup> engl.: Fas associated DD

<sup>23</sup> engl.: TNFR associated DD

genannt DISC<sup>24</sup> (Kischkel et al., 1995), kommt es nach Rekrutierung der Initiator-Caspasen 8/10 über Protein-Domänen, die als DED<sup>25</sup> bezeichnet werden, zu ihrer autokatalytischen Aktivierung (Medema et al., 1997; Wilson et al., 2009).

In manchen Zelltypen, wie T-Lymphozyten, kann über Caspase 8/10 direkt die Aktivierung der Effektor-Caspasen erfolgen. Sie werden Typ I-Zellen genannt. Davon zu unterscheiden sind die Typ II-Zellen, wie Hepatozyten und die  $\beta$ -Zellen der Pankreas (McKenzie et al., 2008; Yin et al., 1999), in denen eine Amplifikation des extrinsischen Apoptose-Signals über den intrinsischen Apoptose-Signalweg notwendig ist (Scaffidi et al., 1998). Somit ergibt sich hier eine Verlinkung zwischen extrinsischem und intrinsischem Apoptose-Signalweg.

### **3.1.2. Intrinsischer Apoptose-Signalweg**

Im intrinsischen Apoptose-Signalweg hat das Mitochondrium eine Schlüsselposition (**Abbildung I**). Hier werden intrazelluläre Signale aus verschiedenen subzellulären Kompartimenten integriert (Galluzzi et al., 2014). Bei massivem Überwiegen von Stress-Signalen wird - reguliert durch Proteine der Bcl<sup>26</sup>-2-Familie - die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran veranlasst. Dadurch kommt es zur Ausschüttung proapoptotischer Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytoplasma, was ihnen erst erlaubt, ihre proapoptotischen Funktionen auszuführen. Zu diesen Proteinen gehören Cytochrom C, SMAC und HtrA2, welche eine Caspasenaktivierung fördern (Kroemer et al., 2007). Cytochrom C bildet dafür ATP-abhängig zusammen mit APAF-1<sup>27</sup> einen heptameren Komplex, das Apoptosom, welches durch die Bindung und Oligomerisierung der Initiator-Caspase 9 als deren Aktivierungsplattform fungiert (Jiang and Wang, 2004; Li et al., 1997; Zou et al., 1999). Die so aktivierte Caspase 9 kann anschließend die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktivieren (Green and Reed, 1998).

Die zusammen mit Cytochrom C freigesetzten Mediatoren SMAC und HtrA2 spielen eine indirekte Rolle in der Caspasen-Aktivierung, indem sie Proteine der

---

<sup>24</sup> engl.: death-inducing signaling complex

<sup>25</sup> engl.: death effector domain

<sup>26</sup> engl.: B-cell lymphoma

<sup>27</sup> engl.: apoptotic peptidase activating factor 1

## I. Einleitung

IAP<sup>28</sup>-Familie inhibieren (Verhagen et al., 2000; Verhagen et al., 2002). Zu dieser Familie zählt das X-linked IAP (XIAP), welches Caspasen direkt hemmen kann (Scott et al., 2005; Shiozaki et al., 2003). Andere IAPs, cIAP<sup>29</sup>1 und cIAP2, beeinflussen die Entscheidung zwischen der Einleitung von Apoptose oder Überlebenssignalwegen nach Stimulation des Todesrezeptors TNFR1 (Varfolomeev et al., 2008).

Neben der Induktion durch intrazellulären Stress kann der intrinsische Apoptose-Signalweg außerdem als Route der Granzym-B-aktivierten Apoptose - einer zytotoxischen Effektorfunktion von CTL - und zur Amplifikation des extrinsischen Apoptose-Signalwegs dienen. Dabei können Granzym-B bzw. aktivierte Caspase 8 aus dem extrinsischen Signalweg das Bcl-2 Protein Bid<sup>30</sup> spalten und dadurch die Permeabilisierung der Mitochondrien in Gang setzen (Barry et al., 2000; Luo et al., 1998; Scaffidi et al., 1998). Wie bereits erwähnt, ist dieser Prozess ist nach extrinsischer Einleitung der Apoptose in bestimmten Zelltypen, den Typ II-Zellen, essentiell für die erfolgreiche Aktivierung von Effektor-Caspasen. Mechanistisch wird diese Notwendigkeit einer mitochondrialen Beteiligung in den Typ II-Zellen mit einer Inhibition der Caspasen durch große Mengen an XIAP erklärt. Erst durch eine Hemmung des Caspasen-Inhibitors XIAP mittels mitochondrial ausgeschüttetem SMAC und HtrA2 kann in den Typ II-Zellen die Caspasen-Kaskade stattfinden (Jost et al., 2009).

## 4. Mitochondrien

Mitochondrien sind hoch strukturierte Organellen von runder bis ovaler oder tubulärer Form, die durch ständige Fusionen und Teilungen ein dynamisches Netzwerk in der Zelle bilden (Detmer and Chan, 2007). Sie sind von einer Doppelmembran umgeben, bei der man die äußere Mitochondrienmembran (OMM<sup>31</sup>) von der inneren Mitochondrienmembran (IMM), die zu sogenannten Cristae aufgefaltet ist, unterscheidet. Während die OMM frei permeabel für Metaboliten, aber nicht für Proteine ist, ist die IMM impermeabel und weitestge-

---

<sup>28</sup> engl.: inhibitor of apoptosis protein

<sup>29</sup> engl.: cellular IAP

<sup>30</sup> engl.: BH3 interacting domain death agonist

<sup>31</sup> engl.: outer mitochondrial membrane



hend undurchlässig für Ionen und Wasser. Zwischen diesen Membranen ergibt sich ein Raum, der als Intermembranraum (IMS<sup>32</sup>) bezeichnet wird, während der Raum innerhalb der IMM Matrix genannt wird (Kroemer et al., 2007). Dieses Membransystem ist essentiell für zwei wichtige Funktionen der Mitochondrien. Dies ist einerseits die Atmung und die oxidative Phosphorylierung, die an der inneren Membran stattfinden, und andererseits die regulierte Permeabilisierung mitochondrialer Membranen, die den funktionellen Zusammenbruch der Organellen und darüber hinaus auch Caspasen-abhängigen und -unabhängigen Zelltod zur Folge haben kann (Galluzzi et al., 2012a).

#### **4.1. Die Rolle von Mitochondrien im Zelltod**

Die Entscheidung, ob eine Zelle ein Todesprogramm initiiert oder nicht, muss strikt reguliert sein. Deshalb laufen Signale über den Status der Zelle, insbesondere Stress-Signale, von unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen am Mitochondrium zusammen (Galluzzi et al., 2014). Zusätzlich können auch extrinsische Signale mit einfließen. Dabei fungieren Mitochondrien als Kontrollzentrum zur Entscheidung über das Schicksal der Zelle: Wenn die Homöostase nicht durch adaptive Prozesse wiederhergestellt werden kann und die Stress- und Gefahrensignale überwiegen, werden sie am Mitochondrium in Todessignale umgesetzt (Galluzzi et al., 2012a). Dies manifestiert sich in der als MOMP<sup>33</sup> bezeichneten Permeabilisierung der OMM. MOMP kann auf zweierlei Wegen ausgeführt werden, die in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben werden. Dies ist einerseits eine Bildung von Kanälen in der OMM, oder andererseits eine Öffnung von Poren in der IMM, die durch osmotisch bedingtes Anschwellen der Mitochondrien eine Ruptur der OMM hervorrufen (Hunter and Haworth, 1979; Pavlov et al., 2001; Ryu et al., 2010).

Durch die Permeabilisierung der OMM kommt es zur Ausschüttung von proapoptotischen Mediatoren aus dem IMS, wie Cytochrom C, SMAC und HtrA2, die eine Caspasen-Aktivierung bewirken. Zusätzlich kann so aber auch Caspasen-unabhängiger Zelltod, regulierte Nekrose, eingeleitet werden. Dies geschieht

---

<sup>32</sup> engl.: intermembrane space

<sup>33</sup> engl.: mitochondrial outer membrane permeabilization

## I. Einleitung

entweder durch die Ausschüttung von Faktoren, wie AIF<sup>34</sup> und Endonuklease G, aus dem IMS (Li et al., 2001; Susin et al., 1999) oder dem irreversiblen Verlust der bioenergetischen Funktion der Mitochondrien, die von der Integrität der IMM abhängt (Kroemer et al., 2007). Somit sind Mitochondrien an der Exekution von verschiedenen Formen des Zelltods beteiligt, an der intrinsischen und in Typ II-Zellen an der extrinsischen Apoptose, sowie an Formen der regulierten Nekrose.

### ***4.1.1. Bcl-2-Proteine kontrollieren die Permeabilisierung der Mitochondrien über die Regulation und Bildung von Poren in der äußeren Membran.***

Die Permeabilisierung der Mitochondrien durch Kanäle in der OMM wird durch Proteine der Bcl-2-Familie kontrolliert. Dabei interagieren Bcl-2-Familien-Mitglieder verschiedener funktioneller Gruppen miteinander: Man unterscheidet antiapoptotische Mitglieder von proapoptotischen Effektor- sowie Initiatorproteinen der Bcl-2-Familie (Youle and Strasser, 2008).

Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine, wie Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1, können die proapoptotischen Mitglieder binden und hemmen. Dadurch wirken sie einer Permeabilisierung der Mitochondrien entgegen, die durch die aktivierten proapoptotischen Effektorproteine Bax, Bak oder Bok erfolgen kann. Bei deren Aktivierung kommt es zu Konformationsänderungen und anschließender Oligomerisierung in der OMM (Basanez et al., 2012; Wei et al., 2001). Dadurch entstehen Poren, die als mitochondriale Apoptose-induzierte Kanäle (MAC<sup>35</sup>) bezeichnet werden (Pavlov et al., 2001; Ryu et al., 2010).

Die Regulation der Bcl-2-Effektorproteine erfolgt vor allem posttranslationell: Wie bereits erwähnt, werden sie einerseits durch die Bindung von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen gehemmt. Andererseits wird ihre Aktivierung von den proapoptotischen Initiatorproteinen, wie Bid und Bim, kontrolliert. Dies kann entweder direkt oder aber indirekt über Bindung und Neutralisierung der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine geschehen (Willis et al., 2007; Youle, 2007).

---

<sup>34</sup> engl.: apoptosis inducing factor

<sup>35</sup> engl.: mitochondrial apoptosis-induced channel

Die proapoptotischen Initiatorproteine selbst unterliegen transkriptioneller, translationeller und posttranslationeller Kontrolle. So werden sie durch Transkriptionsfaktoren und micro-RNAs in ihrer Expression reguliert und durch Phosphorylierung, Proteolyse und Sequestrierung in ihrer Verfügbarkeit und Aktivität kontrolliert (Happo et al., 2012). Bid wird zum Beispiel erst durch Proteasen, wie Caspase 8 oder Granzym B, zu seiner aktiven Form tBid<sup>36</sup> gespalten. Auf diese Weise kann die Bcl-2-vermittelte Permeabilisierung von Mitochondrien neben vielen verschiedenen intrazellulären Signalen auch durch extrazelluläre Signale, wie einer Todesrezeptor-Stimulation, beeinflusst werden (Youle and Strasser, 2008).

#### **4.1.2. Auch die mitochondriale Permeabilitäts-Transition (mPT) kann eine Permeabilisierung von Mitochondrien verursachen.**

Die mPT beschreibt die Steigerung der Durchlässigkeit der IMM für Stoffe mit einem Molekulargewicht mit bis zu 1,5 kDa (Hunter and Haworth, 1979). Als ihr strukturelles Pendant wurde die Existenz einer mPT-Pore (mPTP) postuliert, deren Zusammensetzung noch nicht vollständig geklärt ist. Es werden jedoch verschiedene Proteine als strukturelle und regulatorische Schlüsselkomponenten der mPTP diskutiert (Bonora et al., 2015; Ong et al., 2015). Dazu gehören ANT und die C-Untereinheit der ATP-Synthase in der IMM (Alavian et al., 2014; Hunter and Haworth, 1979; Kokoszka et al., 2004), VDAC<sup>37</sup> (Baines et al., 2007; Szabo and Zoratti, 1993) und der mitochondriale Phosphat-Carrier in der OMM (Gutierrez-Aguilar et al., 2014; Leung et al., 2008) und Cyclophilin D (CypD) in der Matrix. Die Sensitivität der mPT gegenüber Cyclosporin A (CsA), einem Inhibitor von CypD, demonstriert dabei die zentrale Rolle von CypD (Crompton et al., 1988; Hausenloy et al., 2012; Nicolli et al., 1996). Zusätzlich kann die mPTP durch weitere nicht obligate Komponenten beeinflusst werden, wie durch die Bcl-2-Proteine Bax und Bak (Karch et al., 2013).

Die Öffnung der mPTP führt einerseits zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials an der IMM, das für die bioenergetische Funktion der Mitochondrien essentiell ist. Dadurch kann es schließlich zum Mangel von

---

<sup>36</sup> engl.: truncated Bid

<sup>37</sup> engl.: voltage-dependent anion channel

## I. Einleitung

Adenosintriphosphat (ATP), dem universellen Energieträger der Zelle, kommen. Andererseits erfolgt durch die mPTP ein osmotischer Einstrom von Wasser, der zur Schwellung der Matrix und so zum Entfalten der Cristae führt, was letztendlich eine Ruptur und so die Permeabilisierung der OMM (MOMP) zur Folge hat. Somit kann die mPT - wahrscheinlich in Abhängigkeit der ATP-Verfügbarkeit - regulierte Nekrose in Folge einer bioenergetischen Krise oder Apoptose durch die Ausschüttung von IMS-Proteinen verursachen (Bonora and Pinton, 2014; Bonora et al., 2015).

Der bekannteste Auslöser für die mPT ist eine hohe Konzentration an mitochondrialem Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Aber auch oxidativer Stress, Fettsäuren, Gallensalze und anorganisches Phosphat gelten als mPT-Induktoren, während  $\text{Mg}^{2+}$ , ADP und ein geringer pH-Wert die mPT negativ beeinflussen (Bonora et al., 2015; Karimian, 2012). Also wird die mPT über Stress wie Hypoxie und Störungen im Energiestatus und in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase gesteuert.

### ***4.1.3. Verschiedene zelluläre Stress-Signale werden am Mitochondrium über MOMP integriert.***

Die Permeabilisierung der Mitochondrien (MOMP) wird nicht exklusiv entweder durch MAC-Formation oder durch mPT hervorgerufen. Vielmehr überschneiden sich die Regulationsmechanismen und es kann sogar zu einer wechselseitigen Verstärkung der beiden Prozesse kommen. So kann  $\text{Ca}^{2+}$  nicht nur die mPTP induzieren, sondern auch über die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Enzyme Calpain und Calcineurin proapoptotische Initiator-Proteine der Bcl-2-Familie aktivieren. Zudem können Bcl-2-Proteine die Öffnung der mPTP modulieren. Dies geschieht einerseits durch direkte Assoziation mit der mPTP, andererseits über die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (Ryu et al., 2010; Scorrano et al., 2003).

Über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und die verschiedenen Regulationsmechanismen der Bcl-2-Proteine laufen am Mitochondrium Signale aus unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten zusammen und werden in der Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen integriert. Diese Signale entstammen Stress-Antworten der Zelle, Programmen, die als Reaktion auf Störungen der Homöostase im jeweiligen Kompartiment gestartet werden:

Zu den Aufgaben des endoplasmatischen Retikulums (ER) gehören die Proteinsynthese und die Speicherung von  $\text{Ca}^{2+}$ . Zusammen mit den Mitochondrien stellt das ER den größten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher dar und ist für die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase verantwortlich. Dafür stehen die beiden Organellen über Mitochondrien-assoziierte ER-Membranen (MAM) in engem Kontakt miteinander, was einen schnellen Transfer von  $\text{Ca}^{2+}$  vom ER zu den Mitochondrien erlaubt (Rizzuto et al., 2009).

Die Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine, die bei der Proteinsynthese anfallen, oder Störungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase können ER-Stress auslösen (Kroemer et al., 2007), auf den die Zelle mit einer ER-Stress-Antwort reagiert. Diese ist geprägt von einer Hochregulation von Chaperonen (z.B. GRP78<sup>38</sup>), der Inhibition der Translation durch Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ <sup>39</sup> (P-eIF2 $\alpha$ ) und der Aktivierung von Kinasen (PERK<sup>40</sup>) und Transkriptionsfaktoren (z.B. CHOP<sup>41</sup>, alternativ gespleißtes XBP1<sup>42</sup>), die zusammen die Last an ungefalteten Proteinen im ER verringern sollen (Malhi and Kaufman, 2011). Bei anhaltendem Stress kommt es über die Transkriptionsfaktoren CHOP und p53 zur Hochregulation von proapoptotischen Bcl-2-Proteinen (Hetz, 2012; Oyadomari and Mori, 2004; Puthalakath et al., 2007).

Dementsprechend kann das ER sowohl über eine Beeinflussung der Bcl-2 Proteine als auch über eine Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den ER-Speichern auf die Mitochondrien einwirken (Kroemer et al., 2007).

Im Nukleus wird durch Probleme bei der DNA-Replikation oder durch Schäden in der DNA - induziert durch Strahlung und oxidative Addukte - eine DNA-Schadensantwort (DDR<sup>43</sup>) ausgelöst. Die DDR führt einen Arrest in DNA-Replikation und Zellzyklus herbei, um eine DNA-Reparatur zu ermöglichen. Wenn dadurch jedoch die genomische Integrität nicht wiederhergestellt werden kann, induziert die DDR den intrinsischen Apoptose-Signalweg. Viele Effekte

---

<sup>38</sup> engl.: glucose-regulated protein, 78 kDa

<sup>39</sup> engl.: eukaryotic translation initiation factor 2A

<sup>40</sup> engl.: protein kinase R-like endoplasmatic reticulum kinase

<sup>41</sup> engl.: CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein

<sup>42</sup> engl.: X-box binding protein 1

<sup>43</sup> engl.: DNA damage response

## I. Einleitung

werden über ATM<sup>44</sup>-vermittelte Phosphorylierung von H2AX<sup>45</sup> zu  $\gamma$ -H2AX und den Tumorsuppressor p53 vermittelt (Luftig, 2014). Eine DDR kann so die Transkription verschiedener proapoptotischer Bcl-2-Proteine aktivieren (Happo et al., 2012). p53 wirkt aber auch Transkriptions-unabhängig auf die Mitochondrienpermeabilisierung ein (Vaseva and Moll, 2009).

In verschiedenen Zell-Kompartimenten kommt es zur Erzeugung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS<sup>46</sup>). Sie entstehen als Nebenprodukt der Atmung in den Mitochondrien, aber auch im ER und in Peroxisomen, sowie durch NADPH-Oxidasen. Wenn die ROS/RNS nicht mehr durch das antioxidative System der Zelle abgefangen werden können, kommt es zu oxidativem Stress, einer Schädigung von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren und zur Beeinflussung redox-abhängiger Transkriptionsfaktoren (Hansen et al., 2006; Morgan et al., 2008).

Oxidativer Stress führt so zur Aktivierung und Hochregulation von proapoptotischen Bcl-2-Proteinen (Galluzzi et al., 2014; Sermeus et al., 2012; Steckley et al., 2007). Zusätzlich begünstigen Produkte der Lipidperoxidation, wie 4-Hydroxynonenal, eine Mitochondrienpermeabilisierung (Kroemer et al., 2007). Durch direkte Schädigung von Atmungskettenenzymen oder indirekt über Schädigung von mitochondrialer DNA oder Lipidperoxidation kann oxidativer Stress Auswirkungen auf die bioenergetischen Funktionen der Mitochondrien haben. Dies kann eine zusätzliche Amplifikation des oxidativen Stresses in den Mitochondrien verursachen (Dranka et al., 2011; Hill et al., 2012).

### 4.2. Die Rolle von Mitochondrien im Energiemetabolismus

In den Mitochondrien finden der Zitratzyklus und die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) statt, metabolische Prozesse, die sie zu den Hauptproduzenten der Energie von Zellen macht (Galluzzi et al., 2012a).

Dafür wird Pyruvat als Stoffwechselprodukt von Kohlenhydraten über Acetyl-CoA in den Zitratzyklus eingeschleust und dort oxidativ abgebaut. Die Redukti-

---

<sup>44</sup> engl.: Ataxia telangiectasia mutated

<sup>45</sup> engl.: H2A histone family member X

<sup>46</sup> engl.: reactive oxygen/nitrogen species

onsäquivalente aus dem Zitratzyklus, NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub>, werden an der Atmungskette wieder oxidiert.

Die Atmungskette ist eine Folge von Redoxreaktionen, katalysiert durch vier in der IMM lokalisierte Multienzymkomplexe, welche durch im Intermembranraum gelegene Redoxcarrier verbunden sind. Einer dieser Redoxcarrier ist Cytochrom C, das gleichzeitig eine wichtige Funktion im mitochondrialen Apoptose-Signalweg innehält.

Bei der Oxidation von NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub> an Komplex I bzw. Komplex II der Atmungskette werden die Elektronen über mehrere Stufen entlang der Multienzymkomplexe auf Sauerstoff übertragen, der dadurch zu H<sub>2</sub>O reduziert wird. Die bei diesem stark exergonen Elektronentransport frei werdende Energie wird für den aktiven Transport von Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den IMS genutzt, sodass ein elektrochemischer Gradient über der IMM aufgebaut wird. Dieser wird durch das Enzym ATP-Synthase für die oxidative Phosphorylierung, der Produktion von ATP aus ADP, genutzt. Entsprechend sind Elektronentransport, Sauerstoffverbrauch und ATP-Synthese eng miteinander gekoppelt (Löffler, 2005).

## 5. TNF als Vermittler von Zelltod und Entzündung

Der Tumornekrosefaktor (TNF) ist der Prototyp einer Gruppe von Zytokinen, der TNF-Liganden-Familie (Wajant et al., 2003). TNF wird vor allem von Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen, aber auch von anderen Zelltypen, wie Hepatozyten, als Reaktion auf Pathogene und unter inflammatorischen Bedingungen exprimiert (Yoon and Gores, 2002). Dabei wird TNF als trimeres Membranprotein (mTNF) produziert, kann aber durch die Protease TACE<sup>47</sup> von der Membran zu einem löslichen Zytokin (sTNF) abgespalten werden (Black et al., 1997).

TNF vermittelt seine Effekte als Ligand von TNF-Rezeptor 1 (TNFR1), der in fast allen Geweben konstitutiv exprimiert wird, und TNFR2, der vor allem auf Immunzellen, in geringem Ausmaß aber unter anderem auch auf Hepatozyten zu finden ist (Hohmann et al., 1989; Volpes et al., 1992; Wajant et al., 2003). Obwohl

---

<sup>47</sup> engl.: TNF- $\alpha$ -converting enzyme

## I. Einleitung

beide Rezeptoren mTNF und sTNF binden, kann TNFR2 nur durch mTNF vollständig aktiviert werden (Grell et al., 1995).

Ursprünglich wurde TNF in nekrotischen Tumoren als Vermittler von Zelltod entdeckt (Carswell et al., 1975). Später wurde jedoch erkannt, dass TNF durch NFκB-Aktivierung auch zum Überleben und zu Entzündungsreaktionen beitragen kann.

NFκB-Proteine sind eine Familie von dimeren Transkriptionsfaktoren mit fünf verschiedenen Untereinheiten. Die Aktivierung von NFκB kann über einen klassischen oder einen nicht-kanonischen Weg erfolgen und erlaubt die Transkription vieler proinflammatorischer und antiapoptotischer Gene (Chan et al., 2015; Wajant and Scheurich, 2011).

Während TNFR2 den nicht-kanonischen NFκB-Signalweg initiiert, kann TNFR1 durch die sequentielle Bildung unterschiedlicher Multiproteinkomplexe verschiedene Signalwege einleiten (Micheau and Tschopp, 2003). Dazu gehört - obwohl TNFR1 ein Todesrezeptor ist - neben Apoptose und Nekroptose auch der klassische NFκB-Signalweg und die Aktivierung von JNK<sup>48</sup> und MAPK<sup>49</sup> (Chan et al., 2015).

## 5.1. TNFR-Signaltransduktion

### 5.1.1. TNFR 2

Die Stimulation von TNFR2 durch mTNF führt zur Aktivierung des nicht-kanonischen NFκB-Signalwegs. Dabei kommt es durch Rekrutierung von TRAF2<sup>50</sup>, cIAP1 und cIAP2 zu einer Akkumulation der Kinase NIK<sup>51</sup>, die andernfalls durch einen TRAF2- und cIAP1/2-enthaltenden Komplex zur proteasomalen Degradation markiert würde. NIK wiederum ermöglicht die nicht-kanonische Aktivierung der NFκB Untereinheit p52 über IKKα<sup>52</sup> (Naude et al., 2011; Rauert et al., 2010).

---

<sup>48</sup> engl.: c-Jun N-terminal kinase

<sup>49</sup> mitogenaktivierte Proteinkinase

<sup>50</sup> engl.: TNF recetor-associated factor 2

<sup>51</sup> engl.: NFκB-inducing kinase

<sup>52</sup> engl.: inhibtor of κB kinase alpha



### 5.1.2. *TNFR1*

Nach Bindung des trimeren Liganden an TNFR1 kommt es zunächst zur Bildung des kurzlebigen TNFR1-Signal-Komplexes I (Komplex I), durch den eine klassische NFκB-Aktivierung induziert wird (**Abbildung II**). Komplex I baut auf die Bindung des Adapterproteins TRADD über Todesdomänen am TNFR1 auf. Er enthält neben anderen Proteinen außerdem TRAF2, cIAP1 und cIAP2, RIPK1<sup>53</sup> und den Komplex LUBAC<sup>54</sup> (Haas et al., 2009). Die Polyubiquitinylierungen diverser Komponenten des Komplexes -darunter RIPK1 - durch cIAP1, cIAP2 und LUBAC sind verantwortlich für die Assoziation und Aktivierung des IKK<sup>55</sup>-Komplexes. Dieser phosphoryliert den NFκB-Inhibitor IκBα<sup>56</sup> und markiert ihn so für den proteasomalen Abbau (Chan et al., 2015). IκBα bindet NFκB im Zytoplasma - typischerweise Dimere aus den NFκB-Untereinheiten p50/RelA - und maskiert dabei ihre Kernlokalisierungssequenz. Der Abbau von IκBα erlaubt somit die NFκB-Translokation in den Nukleus und die Aktivierung NFκB-abhängiger Transkription (Wajant and Scheurich, 2011).

Zusätzlich zu NFκB können auch p38-MAPK, ERK<sup>57</sup> und JNK durch Komplex I transient aktiviert werden. Diese können durch die Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren, wie AP-1<sup>58</sup> und ATF2<sup>59</sup>, inflammatorische, proliferative und Differenzierungs-Prozesse in Gang setzen (Wajant et al., 2003).

Nach Internalisierung des TNFR1 kann es zur Bildung von Komplex II kommen, der für Todes-Signale des TNFR1 verantwortlich ist. Durch Rekrutierung und Aktivierung der Caspase 8 wird hier die Caspasen-Kaskade und somit die Apoptose eingeleitet. (Chan et al., 2015). Die Aktivierung von Caspase 8 kann dabei in zwei verschiedenen Ausprägungen des TNFR-Komplexes II erfolgen, in Komplex IIa und Komplex IIb.

In Abwesenheit von NFκB-Aktivierung und der damit verbundenen Expression antiapoptotischer Proteine kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung von

---

<sup>53</sup> engl.: receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1

<sup>54</sup> engl.: linear ubiquitin chain assembly complex

<sup>55</sup> engl.: inhibitor of κB kinase

<sup>56</sup> engl.: inhibitor of κB α

<sup>57</sup> engl.: extracellular regulated kinase

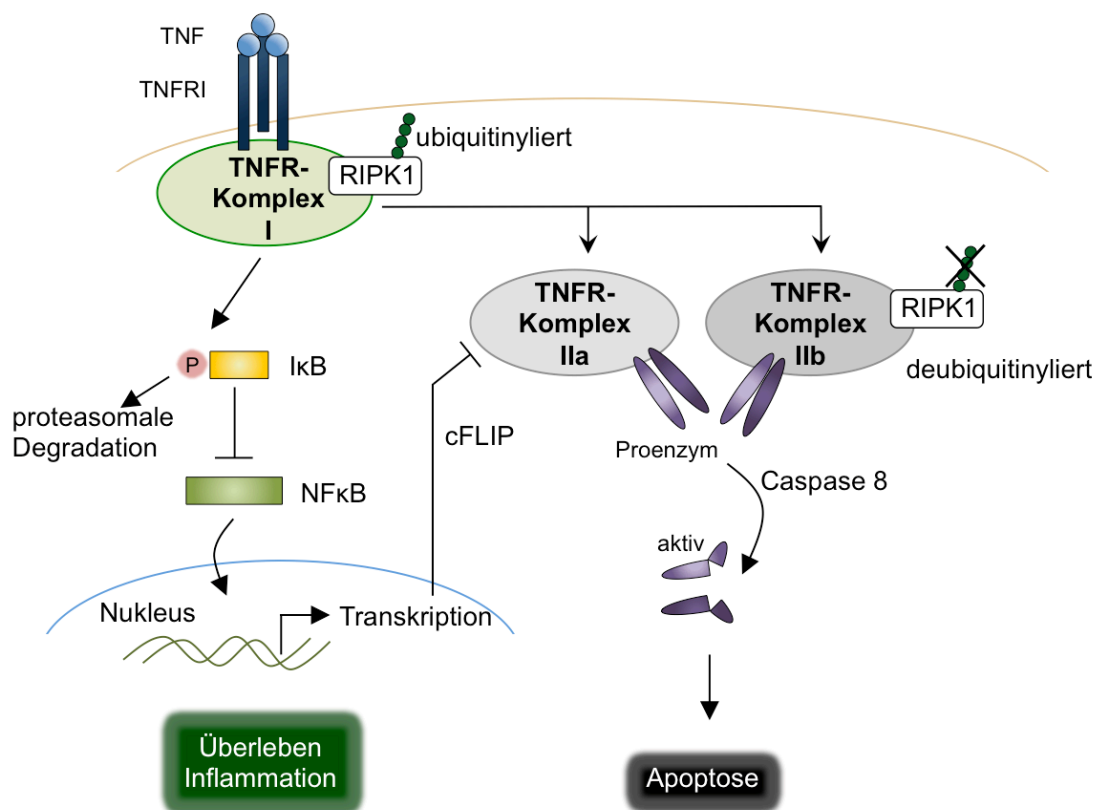
<sup>58</sup> engl.: activator protein 1

<sup>59</sup> engl.: activating transcription factor 2

## I. Einleitung

Caspase 8 in dem TRADD und FADD enthaltendem Komplex IIa. Im Falle einer NFκB-Aktivierung hingegen werden cFLIP<sup>60</sup>, TRAF2 und die Proteine der IAP-Familie hochreguliert, die der Apoptose entgegenwirken (Kreuz et al., 2001; Stehlik et al., 1998; Wang et al., 1998). Dabei scheint cFLIP ein Schlüsselfaktor zu sein, der in Abhängigkeit von NFκB die Caspase 8-Aktivierung in Komplex IIa inhibiert (Micheau and Tschopp, 2003; Wang et al., 2008; Wilson et al., 2009).

Die Bildung des RIPK1 und FADD enthaltenden Komplex IIb ist dagegen unabhängig von NFκB und scheint vielmehr durch eine Deubiquitinylierung von RIPK1 begünstigt zu werden (Christofferson et al., 2014; Dondelinger et al., 2013; Legarda-Addison et al., 2009; O'Donnell et al., 2007). In Abhängigkeit ihres Ubiquitinylierungsstatus hat RIPK1 also gegensätzliche Effekte, indem sie eine NFκB-Aktivierung in Komplex I oder Zelltod über Komplex II induziert (Yang et al., 2015).



**Abbildung II: TNFR1-Signaltransduktion.**

<sup>60</sup> engl.: cellular FLICE-like inhibitory protein

Dementsprechend kann auf verschiedenen Ebenen eine Regulation der TNFR1-Signaltransduktion erfolgen und damit eine Entscheidung zwischen Überleben und Zelltod getroffen werden.

Einerseits erfolgt die Regulation auf der Ebene des Ubiquitin-Netzwerks in Komplex I. Andererseits erfolgt sie über NF $\kappa$ B, welches einen apoptotischen Ausgang der TNFR1-Signaltransduktion verhindert.

Zusätzlich findet auch in nachgeschalteten apoptotischen Signalwegen eine Kontrolle der TNFR1-vermittelten Apoptose statt. Wie oben beschrieben, ist in Typ II-Zellen die Apoptose von Mitochondrien abhängig, was eine Regulation auf mitochondrialer Ebene erlaubt (Jost et al., 2009; Kroemer et al., 2007).

Distal der Mitochondrien im Apoptose-Signalweg wirkt schließlich XIAP durch Hemmung von Caspase 3, 7 und 9 als extrem potenter Apoptose-Inhibitor (Scott et al., 2005; Shiozaki et al., 2003).

## II. Ziele der Arbeit

CTL-Effektorfunktionen zur Eliminierung virusinfizierter Zellen erfordern die Präsentation viraler Antigene auf den Zielzellen, um eine Spezifität dieser Mechanismen für infizierte Zellen zu gewährleisten. Viele Viren haben allerdings Immunevasions-Strategien entwickelt, um die Antigenpräsentation zu unterdrücken, und so den Effektorfunktionen von CTL zu entkommen.

Kürzlich wurde eine neue zytotoxische CTL-Effektorfunktion gegen virale Infektionen der Leber identifiziert, die unabhängig von direkter Antigenpräsentation der Zielzelle ist. Trotzdem betrifft sie hochselektiv nur infizierte Hepatozyten: Sekretiertes TNF führt zur Induktion von Zelltod in virusinfizierten Hepatozyten während uninfizierte Zellen überleben.

Es ist bekannt, dass TNF sowohl Todes- als auch Überlebenssignale induzieren kann, jedoch ist noch nicht vollständig geklärt, unter welchen Umständen der eine oder der andere Signalweg dominiert. Die virale Infektion scheint ein Faktor zu sein, der das Schicksal einer Zelle in Antwort auf TNF beeinflussen kann.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die molekulare Grundlage für die selektive TNF-vermittelte Tötung virusinfizierter Hepatozyten zu untersuchen.

Mit Hilfe eines vereinfachten *in-vivo*-Modells für die TNF-vermittelte zytotoxische CTL-Effektorfunktion sollten insbesondere folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Welcher Todessignalweg steckt hinter der TNF-vermittelten Tötung virusinfizierter Hepatozyten?
- Unterdrückt die virale Infektion Überlebenssignale/-moleküle, die diesen Todessignalweg blockieren würden?
- Beeinflusst eine virale Infektion Mitochondrien, welche eine Kontrollinstanz in Todessignalwegen darstellen?
- Welche initialen zellulären Reaktionen auf eine virale Infektion leiten die Sensibilisierung von Hepatozyten für TNF-vermittelten Zelltod ein?

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen helfen, neue Therapieansätze zur Behandlung viraler Hepatitiden zu identifizieren, die eine virale Immunevasion umgehen.

## III. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1. Geräte

Blot-System, semi-dry	Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad Laboratories, München)
Elektronenmikroskop	EM 10 CR (Zeiss, Oberkochen)
Elektrophoresesystem	Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, München)
Färbeautomat für Immunhistochemie	Bond-MAX (Leica Biosystems, Nussloch)
Heizblock	Thermostar plus (Eppendorf, Hamburg)
Homogenisationskolben	PTFE-kolben, für 15 ml Gefäß (Sartorius, Göttingen)
Homogenisierungszylinder	15 ml (Sartorius, Göttingen)
Imaging-System	ChemiDoc™ MP (Bio-Rad Laboratories, München)
<i>In-vivo</i> -Imaging-System	IVIS® Lumina LT Series III (Caliper Lifesciences, Rüsselsheim)
Inkubator	Hera cell, Hera cell 240 (Heraeus, Hanau)
Lightcycler Instrument	Lightcycler® 480 II Instrument (Roche, Basel, Schweiz)
Mikroskop	DMIL (Leica Microsystems, Wetzlar), CKX41 mit U-RFLT50 und FluoView 1000 (Olympus, Tokio, Japan)
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Safire <sup>2</sup> (Tecan, Männedorf, Schweiz)
NanoDrop	ND-1000 (Nanodrop, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
PCR-Maschine	T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen)
Photometer	Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences, Piscataway, USA)

### III. Material und Methoden

Pipettierhilfe	Matrix Technologies CellMate® (Thermo Scientific, USA)
Potter S	Sartorius, Göttingen
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Pumpe für Perfusion	Masterflex® (Novodirekt, Kehl/Rhein)
Refloton	Reflotron® Plus (Roche, Basel, Schweiz)
Rotoren	6445 (Heraeus, Hanau) 2424B (Hettich, Tuttlingen) JA-12, SW 41 Ti (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA)
Seahorse XF <sup>®</sup> 96 Extracellular Flux Analyzer	Seahorse, North Billerica, MA, USA
Slide Scanner	SCN 400 (Leica Microsystems, Wetzlar)
Sonifikatorstab	UW2070/Sonoplus (Bandelin electronic, Berlin)
Spannungsquelle	PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad Laboratories, München)
Sterilwerkbank	Hera safe (Heraeus, Hanau)
Vibratom	VT 1000 S (Leica Biosystems, Nussloch)
Waage (Fein-)	CP 224 S-0CE, CD 2201 (Sartorius, Göttingen)
Wasserbad	TW8 (Julabo, Seelbach)
Zählkammer (Neubauer-)	0,1 mm 0,0025 mm <sup>2</sup> , (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3S-R (Heraeus, Hanau) Mikro 200R (Hettich Lab technology, Tuttlingen) Avanti J-20XP (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA)
Zentrifuge (Ultra-)	Optima™ LE-80K (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA)

## 1.2. Verbrauchsmaterialien

Dialysekammern	Slide-A-Lyzer®G2 10K MWCO (Thermo Scientific, Rockford, USA)
Kanülen	0,4x20 mm 27G, 0,6x25 mm 23G, 0,8x120 mm (Sterican, B. Braun, Mesungen)
Kapillare, heparinisiert	capilette® for Reflotron, 32 µl (Selzer Labortechnik, Waghäusel)
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten	96 Well - µClear®, CELLSTAR 96 white, (Greiner Bio-One, Frickenhausen), LightCycler® 480 Multiwell plate 96, white (Roche, Basel, Schweiz)
Pasteurpipetten	Pasteur-Plast-Pipetten 1 ml (ratiolab, Dreieich)
Petrischalen	10 cm (Greiner Bio-one, Solingen)
Pipetten (Mess-)	5 ml, 10 ml, 25 ml (Greiner Bio-one, Solingen)
Pipettenspitzen	Standardtips 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Greiner Bio-One, Solingen)
Plattformschüttler, wippend	Duomax 1030 (Heidolph, Schwabach)
PVDF-Membran	Hybond™-P, 0,45 µm (GE Healthcare, Buckinghamshire, England)
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg), 0,2 ml PCR-cup, PP-Röhrchen 50 ml steril, PP-Röhrchen 15 ml steril (Greiner bio-one, Solingen)
Refloton-Messtreifen	ALT, AST (Roche, Basel, Schweiz)
Skalpelle	Feather (Osaka, Japan)
Spritzen	1 ml TBC-Spritzen (Servoprax, Wesel), 2 ml, 5 ml, 10 ml, BD Discardit™ II (BD, Heidelberg)
Sterilfilter	0,2 µm Acrodisc® (Pall, Cornwall, UK)
UZ-Röhrchen	Ultra-Clear™ Tubes, 14x89mm (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)
Vortex-Mixer	neoLab, Heidelberg

### III. Material und Methoden

Whatman Filterpapier	Whatman Chromatography Paper, 3MM Chr (GE Healthcare, Buckinghamshire, England)
Zellkulturschalen	TC-Schale 150 (Sarstedt, Nümbrecht), Zellkulturtestplatte 12 (TPP, Zürich, Schweiz)
Zellkulturschalen	14 cm, rund (TPP, Zürich, Schweiz)

#### 1.3. Chemikalien und Reagentien

Acrylamid	Acrylamid 4K Solution (30%) Mix 37,5:1 (AppliChem, Darmstadt)
ADP (Adenosindiphosphat)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose	Ultrapure™ (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
Antimycin A	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ )	Roth, Karlsruhe
BAPTA AM	Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
BSA (Rinderserumalbumin)	AppliChem, Darmstadt
BSA fettsäurefrei	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Butanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ )	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid ( $\text{CsCl}$ )	AppliChem, Darmstadt
Cheluminate-HRP PicoDetect	AppliChem, Darmstadt
Cyclosporin A	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Decyl-TPP	Zur Verfügung gestellt von Dr. Mike Murphy (MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK)
Dimethylsulfoxid (DMSO, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ )	AppliChem, Darmstadt



Dithiothreitol (DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$ )	AppliChem, Darmstadt
DMEM	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
EGTA ( $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$ )	AppliChem, Darmstadt
Ethanol, absolut ( $C_2H_4O_2$ )	AppliChem, Darmstadt
FCCP	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fluoromount G	eBioscience, San Diego, CA, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Sera Plus (PAN-Biotech, Aidenbach)
Glutamat ( $C_5H_9NO_4$ )	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycin ( $C_2H_5NO_2$ )	AppliChem, Darmstadt
H <sub>2</sub> O, PCR grade	Roche, Basel, Schweiz
HEPES ( $C_8H_{18}N_2O_4S$ )	AppliChem, Darmstadt
Isofluran	Forene® (AbbVie, Ludwigshafen)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	GERBU, Gaiberg
Kaliumhydroxid (KOH)	AppliChem, Darmstadt
Glutamin (L-),(200mM)	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt
Luziferin (D-)	PJK, Blitterdorf
Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ )	Roth, Karlsruhe
Malat ( $C_4H_6O_5$ )	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol ( $C_2H_6OS$ )	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Milchpulver (Mager-)	AppliChem, Darmstadt
MitoQ	Zur Verfügung gestellt von Dr. Mike Murphy (MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK)
MOPS-Tris	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl, 0,9%)	Infusionslösung (B. Braun, Mesungen)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumdeoxycholat ( $C_{24}H_{39}NaO_4$ )	AppliChem, Darmstadt

### III. Material und Methoden

Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Nonident P-40 (NP40, $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ )	AppliChem, Darmstadt
Oligomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd (PFA, $H(-OCH_2)_n-OH$ )	AppliChem, Darmstadt
PBS	PBS Dulbecco (w/o $Ca^{2+}$ , w/o $Mg^{2+}$ ), Biochrom AG, Berlin
PCR-Reaktions-Mix	REDTaq® ReadyMix™ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Pefablock ( $C_8H_{10}FNO_2S$ )	Roth, Karlsruhe
Penicillin (10000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml)	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Percoll	GE-Healthcare Biosciences-AB (Uppsala, Schweden)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, $C_7H_7FO_2S$ )	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphorsäure ( $H_3PO_4$ )	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Proteaseinhibitor-Tabletten	Complete Mini EDTA-free (Roche, Basel, Schweiz)
Proteingrößenstandard	Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
Pyruvat ( $C_3H_3NaO_3$ )	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Q-VD-OPh	BioVision, Milpitas, CA, USA
Restriktionspuffer	FastDigest Green Buffer (10x) (Thermo Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
Rhodamin 123 (Rh123)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rotenon	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Saccharose (D+), ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
SDS ( $C_{12}H_{25}NaO_4S$ )	AppliChem, Darmstadt

Succinat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
SYBR®-Safe	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
TES (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub> S)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tetramethylethylenediamin (TEMED, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub> )	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	GERBU, Gaiberg
Tunicamycin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween-20	AppliChem, Darmstadt

#### 1.4. Puffer und Medien

PBS (Fa. Biochrom) pH 7,4	80 g/l	NaCl
	0,2g/l	KCl
	1,44g/l	NaHPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O
	0,2 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Viruspuffer	10 mM	Tris/HCl pH 7,8
	20 mM	MgCl <sub>2</sub>
CsCl-Puffer	50 mM	Tris/HCl, pH 7,8
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
Dichte 1,25 g/ml	36,16 g/100 ml	CsCl
Dichte 1,40 g/ml	51,2 g/100 ml	CsCl
Dichte 1,34 g/ml	62 g/100 ml	CsCl
Dialysepuffer (10x)	300 g	Saccharose
	87,7 g	NaCl
	20,3 g	MgCl <sub>2</sub>
	100 ml	1 M Tris/HCl pH 7,8
	ad 1000ml	H <sub>2</sub> O

### III. Material und Methoden

RIPA-Puffer	25 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	1%	NP40
	1%	Natriumdeoxycholat
	0,1%	SDS
	pH 7,4	mit HCl
nach Bedarf:	1 Stück/10 ml	Proteaseinhibitor-Tablette
Proteinauftragspuffer (2x)	0,58 M	Saccharose
	4% (w/v)	SDS
	0,04% (w/v)	Bromphenolblau
	62,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
	frisch dazugeben: 60 mg/ml	DTT
SDS-Laufpuffer	3 g	Tris
	14,4 g	Glycin
	1 g	SDS
	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O
Towbin-Puffer		SDS-Laufpuffer
	20% (v/v)	Methanol
TBST	2,42 g	Tris
	8 g	NaCl
	0,1% (v/v)	Tween 20
	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O
	pH 7,6	mit HCl

### III. Material und Methoden

Hypotonischer Extraktions-Puffer (HE-Puffer)	25mM	HEPES pH 7,5
	5mM	MgCl
	1mM	EGTA
	frisch dazugeben: 1mM	Pefablock
	1µg/ml	Aprotinin
	1 µg/ml	Leupeptin
Isolations-Puffer A (IP A)	0,3 M	Saccharose
	5 mM	TES
	0,2 mM	EGTA
	nach Bedarf mit BSA: 0,1%	BSA
	pH 6,9	mit KOH
Isolations-Puffer B (IP B)	0,3 M	Saccharose
	10 mM	TES
	0,2 mM	EGTA
	0,1%	BSA
	pH 7,2	mit KOH
18% Percoll-Lösung	8,5 ml	Isolations-Puffer B
	203 mg	Saccharose
	1,86 ml	Percoll
30% Percoll-Lösung	7 ml	Isolations-Puffer B
	309 mg	Saccharose
	3 ml	Percoll
60% Percoll-Lösung	4 ml	Isolations-Puffer B
	616 mg	Saccharose
	6 ml	Percoll

### III. Material und Methoden

Isolations-Puffer C	10 mM	HEPES-KOH pH 7,4
	0,1 mM	EGTA
	395 mM	Saccharose
Mitochondrien-Puffer	125 mM	KCl
	10 mM	HEPES-KOH pH 7,4
	1 mg/ml	BSA
	3 mM	Succinat
	3 mM	Glutamat
	frisch dazugeben: 10 µM	Q-VD-OPH
	100 µM	PMSF
	3 µg/ml	Aprotinin
	25 µg/ml	Leupeptin
Dilution-Puffer	100 mM	KCl
	25 mM	HEPES-KOH pH 7,4
	1 mg/ml	BSA
Swelling-Puffer	0,2 M	Saccharose
	10 mM	MOPS-Tris
	5 mM	Succinat
	1 mM	Phosphorsäure
	10 µM	EGTA
	pH 7,4	mit Tris
	frisch dazugeben: 2 µM	Rotenon
Respirationspuffer	120 mM	KCl
	5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	3 mM	HEPES
	1 mM	EGTA
	0,3 %	BSA (Fettsäure-frei)
	pH 7,2	mit KOH

HEK-293 Medium	DMEM
10% (v/v)	FCS
2 mM	L-Glutamin
100 U/ml	Penicillin
0,1 mg/ml	Streptomycin

## 1.5. Kit-Systeme

Kit	Hersteller
Bond Refine Detection Kit	Leica Biosystems, Nussloch
Caspase-Glo® Assay (3/7, 8 und 9)	Promega, Madison, WI, USA
DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München
LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master	Roche, Basel, Schweiz
NucleoSpin RNA® II	Macherey-Nagel, Düren
OxiSelect™ <i>In Vitro</i> ROS/RNS Assay Kit	Cell Biolabs, San Diego, CA
Rat/Mouse Cytochrome c Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
XF <sup>e</sup> 96 FluxPak	Seahorse, North Billerica, MA, USA

## 1.6. Antikörper

### 1.6.1. Immunhistologie

Antigen	Einsatz	Wirt	Klon/Nr.	Hersteller
Caspase 3, gespalten	1:1000		9661	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
GFP	1:3000	Kaninchen	20R-GR011	Abcam, Cambridge, UK
RelA	1:200	Kaninchen	RB 1638-P0	NeoMarkers, Fremont, CA, USA

### III. Material und Methoden

#### 1.6.2. Immunoblot – Primärantikörper

Antigen	Einsatz	Wirt	Klon/Nr.	Hersteller
β-Actin	1:1000	Kaninchen	4967	Cell Signaling Technologies (CST), Danvers, MA, USA
ANT	1:400	Ziege	sc-9299	santa cruz biotechnology (scbt), Dallas, TX, USA
Bax	1:1000	Kaninchen	06-499	Millipore
Bcl-2	1:1000	Kaninchen	2870	CST, Danvers, MA, USA
Bcl-XL	1:1000	Kaninchen	2764	CST, Danvers, MA, USA
Bid/tBid	1:1000	Kaninchen	AP21627SU-S	Acris, Herford
Bim	1:1000	Kaninchen	ADI-APP-330	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Caspase 3	1:1000	Kaninchen	9662	CST, Danvers, MA, USA
Caspase 3, gespalten	1:1000	Kaninchen	9664	CST, Danvers, MA, USA
Caspase 8	1:1000	Ratte	804-447- C100	Alexis, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Caspase 8, gespalten	1:1000	Kaninchen	9429	CST, Danvers, MA, USA
Caspase 9, voll und gespalten	1:1000	Kaninchen	9504	CST, Danvers, MA, USA
cFLIP	1:1000	Ratte	AG-20B-0005	Adipogen international, San Diego, CA, USA
CHOP	1:1000	Kaninchen	5554	CST, Danvers, MA, USA
ciAP1/2	1:1000	Kaninchen	CY-P1041	MBL international, Woburn, MA, USA
Cytochrom C	1:1000	Kaninchen	4272	CST, Danvers, MA, USA
GAPDH	1:1000	Kaninchen	5174	CST, Danvers, MA, USA



### III. Material und Methoden

GRP78	1:500	Maus	610978	BD, Heidelberg
H2B	1:1000	Kaninchen	2722	CST, Danvers, MA, USA
Hsp 60	1:5000	Maus	611563	BD, Heidelberg
HtrA2	1:1000	Kaninchen	2176	CST, Danvers, MA, USA
IκB	1:1000	Kaninchen	sc-371	scbt, Dallas, TX, USA
LAMP 2	1:2000	Kaninchen	51-2200	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Mcl-1	1:1000	Kaninchen	600-401-394	Rockland Immunochemicals, Limerick, PA, USA
P-eIF2α	1:1000	Kaninchen	3398	CST, Danvers, MA, USA
P-IκB	1:1000	Maus	9246	CST, Danvers, MA, USA
PARP, gespalten	1:1000	Kaninchen	9544	CST, Danvers, MA, USA
PMP 70	1:500	Kaninchen	5237	Acris, Herford
P-PERK	1:1000	Kaninchen	P3346-01	US Biological, San Antonio, TX, USA
SMAC	1:1000	Kaninchen	AB3609	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
TRAF2	1:1000	Kaninchen	4724	CST, Danvers, MA, USA
VDAC	1:1000	Kaninchen	4866	CST, Danvers, MA, USA
XIAP	1:1000	Maus	M044-3	MBL international, Woburn, MA, USA
γ-H2AX	1:1000	Kaninchen	9718	CST, Danvers, MA, USA

### III. Material und Methoden

#### 1.6.3. Immunoblot - Sekundärantikörper

Zielspezies	Einsatz	Konjugat	Nr.	Hersteller
anti-Kaninchen	1:20000	HRP	112-035-003	Jackson
anti-Ratte	1:20000	HRP	111-035-046	ImmunoResearch,
anti-Maus	1:20000	HRP	115-035-174	West Grove, PA, USA
(leichte Kette)				
anti-Ziege	1:5000	HRP	sc-2768	scbt, Dallas, TX, USA

#### 1.7. Primer

Alle Primer wurden von Eurofins, Ebersberg bezogen.

Zielgen	Sequenz (5'>3'), Forward	Sequenz (5'>3') Reverse	Annealing- Temperatur
a20	GAACCAGAGATTCCATGAAGCAA	CCTGTGTAGTTCGAGGCATGTC	57°C
bax	CTGAGCTGACCTTGGAGC	GA TCCAGCCACAAAGATG	56°C
ciap1	TTGAGCAGCTGTTGTCCACTTC	GGCCAAAATGCACCACTGT	57°C
gapdh	GCAGTGGCAAAGTGGAGATT	TCTCCATGGTGGTGAAGACA	56°C/57°C
xbp1	AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC	TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG	63°C

#### 1.8. Enzyme

PstI                      Thermo Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

#### 1.9. Zytokine und andere rekombinante Proteine

mTNF	Rekombinant mouse TNF (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
hTNF	Rekombinant Human TNF- $\alpha$ (GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
tBid	BID Caspase-8-cleaved (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

### 1.10. Mauslinien

Alle Mauslinien haben C57 BL/6 J-Hintergrund und wurden unter SPF<sup>61</sup>-Konditionen gezüchtet und gehalten.

C57BL/6J (Wildtyp Mäuse, Inzuchtstamm)	Eigene Zucht im Haus für experimentelle Therapie, Bonn (HET), oder bezogen von JANVIER LABS
TRIF KO	Eigene Zucht im HET (Yamamoto et al., 2003)
MyD88 KO	Eigene Zucht im Limes Institut, Bonn (Adachi et al., 1998)
STING KO (Goldenticket, C57BL/6J-Tmem173 <sup>gt</sup> /J)	Zur Verfügung gestellt von Prof. Veit Hornung (Institut für Molekulare Medizin, Universität Bonn), Ursprung: The Jackson Laboratory
ASC KO	Zur Verfügung gestellt von Prof. Veit Hornung (Institut für Molekulare Medizin, Universität Bonn) (Ozoren et al., 2006)
IFNAR KO	Eigene Zucht im HET (Muller et al., 1994)
TNFR1 KO	Zur Verfügung gestellt von Prof. Philipp Lang (Institut für Molekulare Medizin II, Universität Düsseldorf) (Pfeffer et al., 1993)
TNFR2 KO (B6.129S2-Tnfrsf1b <sup>tm1Mwm</sup> /J)	Zur Verfügung gestellt von Prof. Philipp Lang (Institut für Molekulare Medizin II, Universität Düsseldorf), Ursprung: The Jackson Laboratory
TNFR1/2 KO	Eigene Zucht im HET, Ursprung: siehe TNFR1 KO / TNFR2 KO
XIAP KO	Zur Verfügung gestellt von Dr. Jens Seeger (AG Kashkar, Universität Köln)

### 1.11. Zelllinien

HEK-239 (ATCC® CRL-1573™)	ATCC, Manassas, VA, USA
---------------------------	-------------------------

---

<sup>61</sup> engl. specific pathogen free

## 1.12. Viren

### 1.12.1. Rekombinante Adenoviren

Das Backbone der verwendeten adenoviralen Vektoren entspricht dem E1- und E3-deletierten humanen Adenovirus Serotyp 5. Die Vektoren enthielten die gekennzeichneten codierten Gene jeweils unter dem CMV-Promoter.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Codierte Gene</b>	<b>Herkunft</b>
AdGOL	eGFP, Ovalbumin, CBG99-Luziferase	Eigene Herstellung (Wohlleber et al., 2012)
AdLacZ	$\beta$ -Galactosidase	Vector Biolabs, Philadelphia, PA, USA
AdGL	GFP, Renilla-Luziferase	Eigene Herstellung (Wohlleber et al., 2012)
AdmCherry	mCherry	Vector Biolabs, Philadelphia, PA, USA
AdXIAP	XIAP	Vector Biolabs, Philadelphia, PA, USA
AdFLIP	cFLIP	Vector Biolabs, Philadelphia, PA, USA
AdtdTomato	tdTomato	Vector Biolabs, Philadelphia, PA, USA

### 1.12.2. LCMV

Lymphozytäres Choriomeningitis- Virus (LCMV), Stamm WE	Zur Verfügung gestellt von Prof. Karl Lang, Universität Essen
---	--

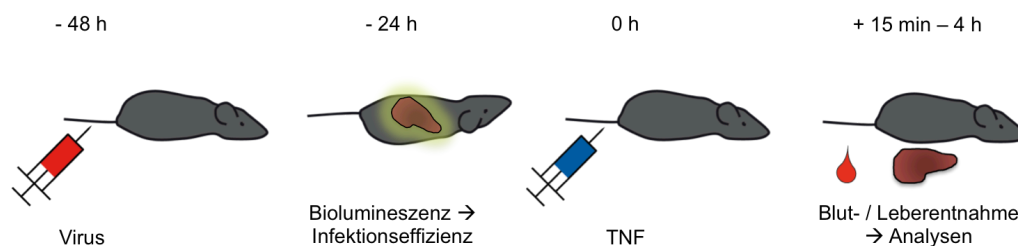
### 1.14. Computersoftware

<b>Software</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Firma</b>
EndNote X7.1	Literaturverwaltung	Thompson Reuters
Excel for Mac 2011	Datenanalyse	Microsoft
Fluoview	Bearbeitung von Fluoreszenzmikroskopie- Aufnahmen	Olympus
Illustrator CS5	graphische Aufarbeitung	Adobe
Image Lab, Version 4.1	Analyse von Aufnahmen des Imaging-Systems	Bio-Rad Laboratories, München
Leica Digital Image Hub	Analyse von Mikroskopiescans	Leica Biosystems, Nussloch
Lightcycler 480 Software 1.5.0 SP4	Durchführung und Analyse von pRT-PCR	Roche, Basel, Schweiz
Living Image 4.3.1	Analyse von Biolumineszenzdaten	Caliper Lifesciences, Rüsselsheim
Magellan 6.6	Analyse von Daten des Mikrotiterplatten-Lesegeräts	Tecan, Männedorf, Schweiz
Photoshop CS5	graphische Aufarbeitung	Adobe
PowerPoint 2011	graphische Aufarbeitung	Microsoft
Prism 5 for Mac OS X	Statistik und graphische Aufarbeitung	GraphPad
Seahorse XF Software Version 1.3	Analyse von respirometrischen Daten	Seahorse, North Billerica, MA, USA
Soft Imaging Viewer	Analyse von EM-Aufnahmen	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
Word 2011	Textverarbeitung	Microsoft

## 2. Methoden

### 2.1. Tiermodell der TNF-vermittelten viralen Hepatitis

Um eine TNF-vermittelte virale Hepatitis zu induzieren, wurde, wenn nicht anders gekennzeichnet, nach dem in **Abbildung III** dargestellten zeitlichen Schema vorgegangen. Die einzelnen Schritte sind in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.



**Abbildung III: Experimentelles Design der TNF-vermittelten viralen Hepatitis**

### 2.2. Virale Infektion

Die Infektion mit Adenoviren erfolgte *i.v.* über die Schwanzvene in einem Volumen von 100  $\mu$ l in 0,9% NaCl. Die Dosis betrug in der Regel  $5 \times 10^8$  PFU pro Maus in Versuchen, in denen klinische Parameter für die Leberzellschädigung bestimmt werden sollten, und  $1 \times 10^9$  PFU pro Maus in Versuchen, in denen an entnommenem Lebergewebe biochemische, histologische und funktionelle Analysen vollzogen werden sollten.

Für eine Ko-Infektion mit verschiedenen Viren wurden diese in einem Ansatz gemischt und in einer Injektion gemeinsam appliziert.

Die Infektion mit  $1 \times 10^5$  PFU LCMV erfolgte ebenfalls *i.v.* über die Schwanzvene in einem Volumen von 100  $\mu$ l in 0,9% NaCl.

### 2.3. *In-vivo*-Biolumineszenzmessung

Um sicherzustellen, dass eine ausreichende Infektion der Mäuse erfolgt ist, wurde als Maß der Infektionseffizienz die Expression des durch AdGOL codierten Enzyms Luziferase gemessen (Stabenow et al., 2010). Wird AdGOL-infizierten Mäusen Luziferin, das Substrat der Luziferase, gespritzt, so kann es in den

infizierten Zellen unter Verbrauch von Sauerstoff und ATP und unter Freisetzung von Energie in Form von Photonen zu Oxiluziferin umgesetzt werden (Marques and Esteves da Silva, 2009).

Diese Biolumineszenz wurde 24 h nach Infektion und 2 min nach Injektion von 2 mg Luziferin in 150 µl Kochsalzlösung *i.p.* quantitativ mit einem IVIS Imaging-System bestimmt. Die Mäuse wurden dafür für etwa 5 min lang mit 2,5 % Isolfluran narkotisiert. Die Auswertung erfolgte mit der Living Image-Software.

## 2.4. Injektionen

### 2.4.1. *TNF*

Die Injektion von 400 ng TNF pro Maus erfolgte 48 h nach Infektion *i.v.* über die Schwanzvene in einem Volumen von 100 µl in PBS. Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurde murines TNF verwendet. Humanes TNF wurde auf dieselbe Weise appliziert.

### 2.4.2. *MitoQ*

MitoQ ist ein zellpermeables, Mitochondrien-spezifisches Antioxidans. Es besteht aus einem antioxidativ wirkenden Ubiquinon, gekoppelt über eine aliphatische Kohlenstoffkette an ein lipophiles Triphenylphosphonium-Kation (TPP), das die mitochondriale Lokalisation bewirkt (Dare et al., 2015). MitoQ wurde in Form von MS010 (MitoQ adsorbiert an  $\beta$ -Cyclodextran) in einer Dosis von 20 mg/kg in 0,9% NaCl täglich für 6 Tage *i.p.* verabreicht. An Tag 4 erfolgte die Infektion, an Tag 6 (2,5 h nach der MitoQ-Injektion) erfolgte die TNF-Applikation.

Kontrollgruppen erhielten Decyl-TPP, dem die Ubiquinon-Gruppe fehlt, in gleicher Darreichungsform wie MitoQ.

### 2.4.3. *Tunicamycin*

Tunicamycin wurde zur Induktion von ER-Stress in einer Dosierung von 0,75 µg/kg *i.v.* appliziert, um 6 und 24 h später die Lebern zu entnehmen.

### III. Material und Methoden

#### **2.4.4. BAPTA AM**

BAPTA AM ist ein zellpermeabler  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator, der hochselektiv für  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{Mg}^{2+}$  ist. BAPTA wurde in einer Dosis von 20 mg/kg in 40  $\mu\text{l}$  DMSO 15 min vor TNF-Injektion *i.p.* injiziert. Den Kontroll-Tieren wurde 40  $\mu\text{l}$  DMSO injiziert.

#### **2.4.5. Cyclosporin A (CsA)**

CsA, ein Inhibitor von Cyclophilinen, wurde zur Inhibition der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition (mPT) in einer Dosis von 50 mg/kg, in 30  $\mu\text{l}$  DMSO 30 min vor TNF-Injektion *i.p.* injiziert. Den Kontroll-Tieren wurde 30  $\mu\text{l}$  DMSO injiziert.

### **2.5. Adenovirusproduktion und Titration**

#### **2.5.1. Virusvermehrung**

Da die verwendeten Adenoviren eine Deletion von E1 und E3 in ihrem Genom tragen, wurde ihre Vermehrung in HEK-293 Zellen ermöglicht, die E1 exprimieren.

Für deren Infektion wurde  $1 \times 10^8$  PFU Adenovirus pro Zellkulturplatte auf die 80% konfluenten Zellen gegeben. Nach etwa 48 h, wenn die Zellen begannen, sich abzulösen, wurden die Zellen durch Klopfen und Spülen komplett gelöst und samt Medium abgenommen. Nach 10 min Zentrifugation bei 1500 Upm und 4°C, wurde der Überstand verworfen, da davon ausgegangen wurde, dass sich der Großteil des neu produzierten Virus zu diesem Zeitpunkt noch in den Zellen befindet. Das Pellet wurde in bis zu 6 ml Viruspuffer resuspendiert und die Zellen durch 3-maliges schnelles Einfrieren (in flüssigem Stickstoff) und Auftauen (im Wasserbad, 37°C) aufgebrochen. Zelltrümmer wurden durch 2-fache Zentrifugation bei 4000 Upm und 4°C für 5 bzw. 10 min sedimentiert. Die Aufreinigung kompletter Viruspartikel aus dem Überstand erfolgte mittels Cäsiumchloridgradienten.



#### **2.5.2. Ultrazentrifugation mit Dichtegradienten**

Dazu wurde in Ultrazentrifugenröhrchen 2,5 ml 1,25-CsCl-Puffer mit 1,4-CsCl-Puffer unterschichtet und mit der Viruslösung überschichtet. Das Gefäß wurde mit Viruspuffer aufgefüllt und dann für 1 h bei 35000 Upm und 4°C mit maximaler Beschleunigung und Bremseinstellung „slow“ ultrazentrifugiert. Mit Hilfe einer Spritze und spitzen Kanüle wurde das Röhrchen unterhalb der untersten Bande durchstoßen und die Bande vorsichtig abgenommen. Die abgenommene Lösung wurde mit Viruspuffer verdünnt und auf 8 ml 1,34-CsCl-Puffer in ein neues Röhrchen gegeben. Die zweite Ultrazentrifugation erfolgte bei 30000 Upm und 4°C für 18 h und die resultierende Bande wurde wie zuvor abgenommen.

#### **2.5.3. Dialyse**

Die Viruslösung wurde in eine Dialysekammer überführt und unter Rühren in 1 l Dialysepuffer dialysiert. Der Puffer wurde 3 Mal erneuert, nach 30 min, eine Stunde später und eine weitere Stunde später.

Die Viruslösung wurde aliquotiert bei -80°C aufbewahrt. Zur Infektion von Mäusen wurden immer neue Aliquots verwendet.

#### **2.5.4. Titration**

$2,5 \times 10^5$  HEK-293 Zellen pro Well wurden in einer 12-Well-Platte in je 1 ml Medium ausgesäht. Am nächsten Tag wurden die Zellen in jedem Well mit einem anderen Volumen an Viruslösung infiziert. 48 h nach Infektion wurde das Well mit dem geringsten Virustiter identifiziert, bei dem sich die Zellen aufgrund der Infektion gerade noch komplett vom Boden abgelöst haben.

Erfahrungswerten entsprechend wurde der Titer des Adenovirus in PFU/ml festgelegt:

<b>Volumen der Viruslösung (µl)</b>	<b>Virustiter (PFU/ml)</b>
30	$1,7 \times 10^8$
10	$5 \times 10^8$
3	$1,7 \times 10^9$
1	$5 \times 10^9$
0,3	$1,7 \times 10^{10}$
0,1	$5 \times 10^{10}$
0,03	$1,7 \times 10^{11}$
0,01	$5 \times 10^{11}$

## **2.6. Blutentnahme und Ermittlung der ALT- und AST-Aktivitäten**

Als klinischer Parameter für eine Leberzellschädigung wurde die Aktivität der ALT und der AST im Blut oder Serum der Mäuse bestimmt. Dafür wurde den Mäusen sowohl 48 h nach Infektion (vor Injektion von TNF) als auch 2 h oder 4 h nach TNF-Injektion je 32 µl Blut durch Punktion der Schwanzvene mit einer Kapillare entnommen. Die Entnahme des Bluts vor TNF-Gabe diente als Negativ-Kontrolle für TNF.

Das Blut wurde direkt von der Kapillare oder in PBS vorverdünnt auf einen Teststreifen gegeben, der im Refloton-Messgerät analysiert wurde.

## **2.7. Leberentnahme**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet. Anschließend wurde die Leber für etwa 10 s über die Pfortader mit kaltem PBS perfundiert, um Blut auszuspülen.

## **2.8. Quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)**

### **2.8.1. RNA-Isolation**

Kleine (ca. 2-3 mm Kantenlänge) Leber-Gewebestücke wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem Kit Nucleo-Spin RNA II nach Anleitung des Herstellers. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop bestimmt.

#### 2.8.2. *cDNA-Synthese*

Mit Hilfe des SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit wurde nach Anleitung des Herstellers die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. In einem Reaktionsansatz von 20 µl wurde dabei 1 µg RNA eingesetzt.

#### 2.8.3. *qPCR*

Die qPCR wurde in 96-Well-Platten unter Verwendung des LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master im Lightcycler® 480 Instrument durchgeführt. Zur Normalisierung wurde für jede cDNA-Probe auch ein Ansatz mit Primern gegen gapdh analysiert. Zur Berechnung der Primereffizienzen wurden 10x-Verdünnungsreihen einer cDNA-Probe von  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  für jedes verwendete Primerpaar mitgeführt. Anhand der Schmelzkurve wurde die Qualität der qPCR überprüft. Die Auswertung erfolgte mittels Lightcycler 480 Software, wobei die Werte gegen gapdh normalisiert wurden.

Reaktionsansatz:

SYBR Green I Master	10 µl
Primer (10 µM), jeweils	2 µl
H <sub>2</sub> O, PCR grade	4 µl
cDNA	2 µl

Programm:

Denaturierung	95°C	4,4°C/s	10 min
Amplifizierung	95°C	4,4°C/s	20 s
	* °C	2,2°C/s	15 s
	72°C	4,4°C/s	30 s
Schmelzkurve	95°C	4,4°C/s	1 s
	50°C	2,2°C/s	10 s
	95°C	0,11°C/s	

\* Annealing-Temperatur der eingesetzten Primerpaare

## 2.9. XBP1-Spleißing-Assay

Da XBP1 unter ER-Stress alternativ gespleißt wird, kann die alternative Spleiß-Isoform als ER-Stress-Marker dienen. Um die verschiedenen Isoformen zu detektieren, wurde wie oben beschrieben aus Lebergewebe RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, um anschließend eine PCR durchzuführen.

Reaktionsansatz:

Red Taq ready mix	12,5 µl
Primer (10 µM), jeweils	1 µl
cDNA	1 µl
H <sub>2</sub> O	9,5 µl

Annealing-Temperatur: 63°C

Das PCR-Produkt hat nach alternativem Spleißen eine geringere Größe und verliert eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym PstI. Dadurch sind die beiden Spleiß-Isoformen zu unterscheiden.

Ein Verdau mit 1 µl PstI pro 10 µl PCR-Produkt wurde in einem 20 µl-Ansatz für 1,5 h bei 37°C durchgeführt.

Die Spleißisoformen im unverdauten und PstI-verdauten PCR-Produkt wurden durch Elektrophorese in einem 2% Agarose-Gel aufgetrennt. Die DNA wurde durch SYBR®-Safe (1:10000) mit einem Imaging-System (ChemiDoc™ MP) visualisiert.

## 2.10. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die zu analysierenden Proteinlösungen lagen als Gewebelysate in verschiedenen Puffern vor. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des Kit-Systems DC™ Protein Assay nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dazu wurden BSA-Standards in den jeweiligen Puffern verwendet. Die Messung der optischen Dichte bei 750 nm erfolgte per Photometer. Die Konzentrationen wurden mit Prism und Excel berechnet.

## 2.11. Immunoblot

### 2.11.1. Gewebeaufschluss

Kleine Leber-Gewebestücke (ca. 3-5 mm Kantenlänge) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Gewebestücke wurden auf Eis in 250 µl RIPA-Puffer lysiert. Nach einer Behandlung für 7 s mit Ultraschall zum kompletten Gewebeaufschluss und zur Zerkleinerung der DNA wurden die Proben für 10 min bei 16000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C eingefroren oder direkt zur Proteinbestimmung und Elektrophorese eingesetzt.

### 2.11.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE-Gele wurden anhand von Tabelle 1 selbst hergestellt.

**Tabelle 1: Acrylamidgele**

	Sammelgel	Trenngel			
		8%	10%	12%	14%
Acrylamid (ml)	0,41	1,78	2,23	2,67	3,11
H <sub>2</sub> O (ml)	1,93	3,05	2,60	2,17	1,72
Tris/HCl (ml)	0,83	1,67			
10% SDS (µl)	33,3	66,7			
5% APS (µl)	83,3	100,0			
TEMED (µl)	2,7	3,3			

Dafür wurde zunächst das Trenngel mit 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) gegossen und mit Butanol beschichtet. Die Prozentigkeit des Gels richtete sich nach der Größe des zu untersuchenden Proteins. Nach ca. 45 min wurde das Butanol abgegossen und -gesaugt. Darüber wurde ein mindestens 1 cm hohes Sammelgel mit 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) gegossen und ein Kamm eingesetzt.

Die Proben wurden mit H<sub>2</sub>O entsprechend der Proteinbestimmung auf dieselbe Konzentration gebracht, anschließend 1:1 mit 2x Proteinladepuffer versetzt und

### III. Material und Methoden

10 min bei 95°C erhitzt. Gleiche Mengen der Proben (entsprechend 20-50 µg Protein) und 7 µl Protein-Standard wurden daraufhin auf das Gel geladen.

Die Auftrennung erfolgte in einer Gelkammer, gefüllt mit SDS-Laufpuffer, zunächst bei 80 V, dann bei 100 V für insgesamt 1-2 h.

#### **2.11.3. Western Blot, semi-dry**

Nach dem Auftrennen der Proteine wurde das Gel aus der Halterung entfernt und das Sammelgel sowie unbenutzte Bereiche des Trenngels abgetrennt. Zuvor wurden Whatman-Filterpapiere und eine PVDF-Membran auf das Gel zugeschnitten. Die Membran wurde für 5 s in Methanol, dann für 15 min in Towbin-Puffer inkubiert, die Filter nur kurz mit Towbin-Puffer benetzt. Filterpapier, Membran und Gel wurden folgendermaßen in einer Blotkammer geschichtet und dabei Luftblasen ausgestrichen:

Kathode  
3x Filterpapier  
Gel  
Membran  
3x Filterpapier  
Anode

Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte für 30 min bei 23 V mit einer maximalen Stromstärke von 2,5 mA.

#### **2.11.4. Immundetektion**

Die Membran wurde mit 10% Milchpulver/TBST für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde sie über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in 10% BSA/TBST inkubiert. Nach 3-maligem Waschen für je 10 min mit TBST wurde sie für 1 h bei 4°C mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in 5% Milchpulver/TBST inkubiert.

Nach weiteren 3 Waschschritten wurde die Membran kurz aber gleichmäßig mit Cheluminate-HRP PicoDetect benetzt und die Lumineszenz CCD-basiert für bis zu 20 min mit einem Imaging-System (ChemiDoc™ MP) detektiert. Die Bearbeitung erfolgte mit der Image Lab Software und PowerPoint.

## **2.12. Bestimmung der Caspasen-Aktivität**

Die Bestimmung der Aktivität von Caspase 8, 9 oder 3/7 wurde mit Hilfe des Caspase-Glo® Assays von Promega nach den Angaben des Herstellers bzw. nach der Beschreibung von Yi et al. (2006) durchgeführt. Kleine (ca. 3 mm Kantenlänge) Leber-Gewebestücke wurden auf Eis in 200 µl HE-Puffer lysiert. Nach 1- bis 2-maliger Zentrifugation für 10 min bei 16000 g und 4°C wurde der Überstand einer Bestimmung der Proteinkonzentration unterzogen und auf 40 µg/ml mit HE-Puffer verdünnt. 30 µl der Probe wurden mit dem Caspase-Glo-Reagenz 1:1 in einer weißen 96-Well-Platte gemischt. Nach 90 minütiger Inkubation bei RT wurde die Lumineszenz im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Magellan und Excel.

## **2.13. Bestimmung von ROS/RNS**

30 mg schwere Leber-Gewebestücke wurden auf Eis in 200 µl RIPA-Puffer ohne zugesetzte Protease-Inhibitoren lysiert. Nach Zugabe von 800 µl PBS wurde für 5 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert und 50 µl des Überstands für die ROS/RNS-Analyse eingesetzt. Zur späteren Normalisierung wurde vom Überstand auch eine Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt.

Die ROS/RNS-Bestimmung erfolgte mit dem OxiSelect™ *In Vitro* ROS/RNS Assay Kit nach Herstellerangaben. Die Fluoreszenz wurde mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

## **2.14. Histologie**

### **2.14.1. Immunhistochemie**

Zur Immunhistochemischen Analyse wurden die Lebern nach Möglichkeit vor der Entnahme für ca. 10 s über die Pfortader mit kaltem 4% Paraformaldehyd (PFA)/PBS perfundiert. Alternativ wurden mit PBS perfundierte Lebern auf gleiche Weise verwendet. Etwa 5 mm breite Streifen wurden aus dem großen Leberlappen geschnitten und für 4 Tage in 4% PFA/PBS bei 4°C fixiert. Daraufhin wurden die Gewebestücke in 0,1% PFA/PBS aufbewahrt und in der Arbeitsgruppe von Prof. Heikenwälder (Institut für Virologie, Technische Universität

### III. Material und Methoden

München/Helmholtz Zentrum München) wie zuvor beschrieben weiterverarbeitet (Wolf et al., 2014). Nach der Einbettung in Paraffin wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt und für eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) oder immunhistologische Färbungen mittels Primär-Antikörpern gegen GFP, gespaltene Caspase 3 und RelA und dem Bond Refine Detection Kit am Leica Bond-MAX verwendet. Die Objektträger wurden mit dem SCN 400 slide scanner gescannt und die Aufnahmen wurden per Leica Digital Image Hub bearbeitet.

#### **2.14.2. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fixierung des Lebergewebes erfolgte wie für die Immunhistochemie. Mit dem Vibratom wurden 150 µm dicke Schnitte angefertigt und in Fluoromount G auf einem Objektträger eingedeckt. Mikroskopiert wurde mit dem Fluo-View 1000. Die Aufnahmen wurden mittels Fluoview-Software getätigt und mit PowerPoint bearbeitet.

#### **2.14.3. Elektronenmikroskopie**

100-200 µg isolierte Mitochondrien wurden in konischen Gefäßen mit quadratischem Boden für 10 min, bei 4°C und 12000 g mit einem Ausschwingrotor (SW 41 Ti) pelletiert und in 2,5% Glutaraldehyd/0,1M Cacodylatpuffer inkubiert.

Für Gewebe-Aufnahmen wurden die Lebern für 1 min mit 4% PFA/PBS über die Pfortader perfundiert, entnommen und kleine Gewebestücke aus dem großen Leberlappen in 2,5% Glutaraldehyd/0,1M Cacodylatpuffer inkubiert.

Die folgenden Schritte wurden von Sabine Schmitt (AG PD Dr. Zischka, Institut für Molekulare Toxikologie und Pharmakologie, Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt) und Dr. Michaela Aichler (Institut für Pathologie, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Die Proben wurden mit Osmiumsäure nachfixiert, mit Ethanol und Propylenoxid entwässert und in Epon eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleizitrat kontrastiert und mit einem EM 10 CR Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, Germany) und Soft Imaging Viewer (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany) analysiert.



## 2.15. Isolation von Maus-Lebermitochondrien

Die Mitochondrienisolation aus Lebergewebe von Mäusen wurde durchgehend auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Nach der Entnahme wurde die Leber in PBS gewaschen, die Gallenblase entfernt, das Lebergewebe grob zerschnitten und mit 10 ml Isolations-Puffer A mit BSA im Potter S durch 1-3 Stöße homogenisiert. In einem Volumen von 50 ml Isolations-Puffer A mit BSA wurde das Homogenat 2-mal für 10 min bei 800 g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen, und der Überstand daraufhin für 10 min bei 9000 g zentrifugiert, um Mitochondrien zu pelletieren. Der dabei erzeugte Überstand entsprach der zytoplasmatischen Fraktion. Das Pellet wurde, ohne Luftblasen zu erzeugen, in 1 ml Isolations-Puffer A mit BSA resuspendiert und vorsichtig auf einen Percoll/Saccharose-Gradienten gegeben. Für den Gradienten wurden 8 ml 18% Percoll-Puffer mit 8 ml 30% Percoll-Puffer und darunter 8 ml 60% Percoll-Puffer in einem 50 ml-Röhrchen unterschichtet. Der Gradient wurde für 10 min bei 9000 g zentrifugiert und mit einer Pasteurpipette die Bande an der 30%/60%-Grenze abgenommen. Die Mitochondrien wurden daraufhin noch 2-mal mit IP-Puffer für 10 min bei 9000 g gewaschen, um die mitochondriale Fraktion zu erhalten. Die isolierten Mitochondrien wurden ausschließlich mit 1000 µl- oder abgeschnittenen 200 µl-Pipettenspitzen pipettiert.

## 2.16. Funktionale Analysen isolierter Mitochondrien

### 2.16.1. *Stimulation isolierter Mitochondrien mit tBid zur Analyse der Ausschüttung von IMS-Proteinen*

Isolierte Mitochondrien wurden nach dem Protokoll „Recombinant Mouse BID Cytochrome c Release Assay“ (R&D) in Isolations-Puffer C aufgenommen und in einer Konzentration von 2,25 mg Protein pro ml verwendet. 24 µl Mitochondrien wurden mit 56 µl Mitochondrien-Puffer und 30 µl tBid (500, 150, 50, 0 µM) in Dilution-Puffer gemischt, für 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert und dann auf Eis transferiert. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 16000 g und 4°C wurde der Überstand zur Analyse im Cytochrom C ELISA oder Immunoblot eingesetzt. Für die Analyse der maximalen Ausschüttung mitochondrialer

### III. Material und Methoden

Proteine wurden die Mitochondrien nach Inkubation bei 30°C für 10 min bei 4°C mit 0,5% Triton X-100 inkubiert und anschließend bei 16000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Analyse verwendet.

#### **2.16.2. Cytochrom C ELISA**

Zur Bestimmung der Cytochrom C Konzentration im Überstand von isolierten Mitochondrien wurde das Rat/Mouse Cytochrome c Quantikine ELISA Kit von R&D nach Herstellerangaben angewendet. Die Überstände, die aus der Stimulation isolierter Mitochondrien mit tBid hervorgegangen sind, wurden dafür im Verhältnis 1:36 verdünnt. Der ELISA wurde mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät eingemessen.

#### **2.16.3. Bestimmung der relativen Sensitivität isolierter Mitochondrien gegenüber $\text{Ca}^{2+}$ -/*Bid*-induzierter Permeabilitäts-Transition (mPT)**

Die relative Sensitivität isolierter Mitochondrien gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierter mPT wurde anhand von zwei Parametern bestimmt. Die mPT geht mit einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und einem Anschwellen der Mitochondrien einher. Das Anschwellen der Mitochondrien wurde anhand der optischen Dichte bei 540 nm ( $\text{OD}_{540\text{nm}}$ ) der Mitochondriensuspension und Änderungen im Membranpotential über den Potential-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (Rh123) verfolgt. Die Fluoreszenz wurde mit einer Anregung bei 485/20 nm und Emission bei 528/20 nm gemessen. Um die OD und Fluoreszenz simultan bestimmen zu können, wurden Mikrotiterplatten mit transparentem Boden und schwarzen Wänden verwendet. Die isolierten Mitochondrien wurden mit Swelling-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt. Es wurden verschiedene Reaktionsansätze mit je einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  in Triplikaten pipettiert (Tabelle 2) und die Messung mit dem Safire2 Plattenlesegerät unmittelbar danach gestartet. Über 100-200 min wurde etwa alle 1,5 min eine Messung durchgeführt.

Pro Reaktionsansatz wurden Mitochondrien entsprechend 150  $\mu\text{g}$  Protein eingesetzt.

100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) wurde als Induktor der mPT verwendet und zügig jeweils als Letztes zum Reaktionsansatz pipettiert. Zur Kontrolle wurden 5  $\mu\text{M}$

Cyclosporin A (CsA) als Inhibitor der mPT, und 1  $\mu$ M FCCP als unspezifischer Auslöser für einen Membranpotentialverlust eingesetzt.

Analog zu  $\text{Ca}^{2+}$  wurde das Potential von 100 nM rekombinantem tBid untersucht, eine mPT auszulösen.

**Tabelle 2: Reaktionsansätze für  $\text{Ca}^{2+}$ -/Bid-induzierte Permeabilitäts-Transition**

	Mitochondrien	Rh123	CsA	FCCP	$\text{Ca}^{2+}$	tBid
Basal:	+	+				
$\text{Ca}^{2+}$ :	+	+			+	
$\text{Ca}^{2+}$ + CsA:	+	+	+		+	
FCCP:	+	+		+		
tBid:	+	+				+
tBid + CsA:	+	+	+			+

#### **2.16.4. *Respirometrie***

Die Respirometrie wurde in Kooperation mit Dr. Kerstin Haas (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Klingenspor, Molekulare Ernährungsmedizin, Technische Universität München) durchgeführt. Die mitochondriale Atmung wurde anhand des Sauerstoffverbrauchs von Präparationen isolierter Mitochondrien mit dem Seahorse XF<sup>e</sup>96 Extracellular Flux Analyzer untersucht.

Die Cartidge wurde für mindestens 8 h mit XF Calibrant (XF<sup>e</sup>96 FLuxPak) präinkubiert. Isolierte Mausleber-Mitochondrien wurden in 20  $\mu$ l Respirationspuffer verdünnt und in einer Menge von 3  $\mu$ g/Well eingesetzt. Die Mitochondrien wurden bei 2000 x g, 4°C für 20 min auf den Messplatten abzentrifugiert. Während der Kalibrierung der Cartridge, bei der eine Adjustierung der Sensoren in der Maschine erfolgt, wurde in die Messplatte 160  $\mu$ l Respirationspuffer incl. Substrat zu den Mitochondrien pipettiert. Dann wurde die Messplatte wurde auf 37°C erwärmt, bis die Kalibrierung beendet war (15-20 min). Die Sauerstoffkonzentration in den Wells über die Zeit wurde initial und jeweils nach vier Injektionen entsprechend des Protokolls in Tabelle 3 gemessen.

**Tabelle 3: Protokoll der Messung im Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer**

Aktion	Zeit (min)	Fortsetzung von linker Spalte	
Kalibrierung	0,00	Injektion	Port B
Mixen	1,50	Mixen	2,00
Warten	3,00	Messung	3,00
Mixen	1,50	Mixen	2,00
Warten	3,00	Messung	3,00
Mixen	1,50	Mixen	2,00
Messung	3,00	Injektion	Port C
Mixen	2,00	Mixen	2,00
Messung	3,00	Messung	3,00
Mixen	1,00	Mixen	2,00
Injektion	Port A	Messung	3,00
Mixen	2,00	Mixen	2,00
Messung	3,00	Injektion	Port D
Mixen	2,00	Mixen	2,00
Messung	3,00	Messung	3,00
Mixen	2,00	Mixen	2,00
Messung	3,00	Messung	3,00
Fortsetzung siehe rechte Spalte			

Die basale Atmung wurde durch das dem Respirationspuffer bereits zugesetzte Substrat Succinat/Rotenon bzw. Pyruvat/Malat stimuliert und in der initialen Phase gemessen. Durch die Injektion von ADP wurde die maximale ATP-Produktion angeregt. Die Hemmung der ATP-Synthase erfolgte durch Oligomycin in der folgenden Injektion. Mit der dritten Injektion wurde durch den Protonophor FCCP die entkoppelte Atmung angeregt. Schließlich wurde Antimycin A injiziert, welches den Elektronenfluss an Komplex III blockiert und dadurch die mitochondriale Atmung stoppt. Die Atmung wurde als Sauerstoffverbrauchsrate (OCR<sup>62</sup>) ausgedrückt und auf die Citratsynthase-Aktivität der Mitochondrienprä-

---

<sup>62</sup> engl.: Oxygen consumption rate

parationen normalisiert. Die Kalkulation der OCR erfolgte automatisch durch die Seahorse XF Software Version 1.3.

Die eingesetzten Substanzen wurden wie folgt gelöst und bei -20°C aufbewahrt:  
1 M Succinat in H<sub>2</sub>O, pH 7,4; 1 M Pyruvat in H<sub>2</sub>O; 2.5 M Malat in H<sub>2</sub>O, pH 7.4; 1 M ADP in H<sub>2</sub>O, pH 7.4; 2.5 mM Rotenon, 2 mg/ml Oligomycin, 2.5 mM FCCP, 2.5 mM Antimycin A, jeweils in DMSO

Endkonzentrationen der eingesetzten Substanzen in der Messplatte:

10 mM Succinat; 8 µM Rotenon; 5 mM Pyruvat; 5 mM Malat; 6 mM ADP; 2.5 µg/ml Oligomycin; 4 µM FCCP; 4 µM Antimycin A

#### ***2.16.5. Messung der Citratsynthase-Aktivität***

Die Probenaufbereitung und Analyse der Citratsynthase-Aktivität wurde von Dr. Kerstin Haas (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Klingenspor, Molekulare Ernährungsmedizin, Technische Universität München) durchgeführt.

#### **2.17. Statistik**

Wenn nicht anders gekennzeichnet, ist ein repräsentativer von mindestens zwei durchgeführten Versuchen abgebildet. Die Fehlerbalken stellen bei Balkendiagrammen die Standardabweichung (SD<sup>63</sup>), bei Punktdiagrammen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM<sup>64</sup>) für die Gruppengröße (n) dar. Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mit der Software Prism durch einem zweiseitigen Student's t-Test durchgeführt (mit \*=p<0,05; \*\*= p<0,01; \*\*\* = p<0,001; ns= nicht signifikant).

---

<sup>63</sup> engl.: standard deviation

<sup>64</sup> engl.: standard error of mean

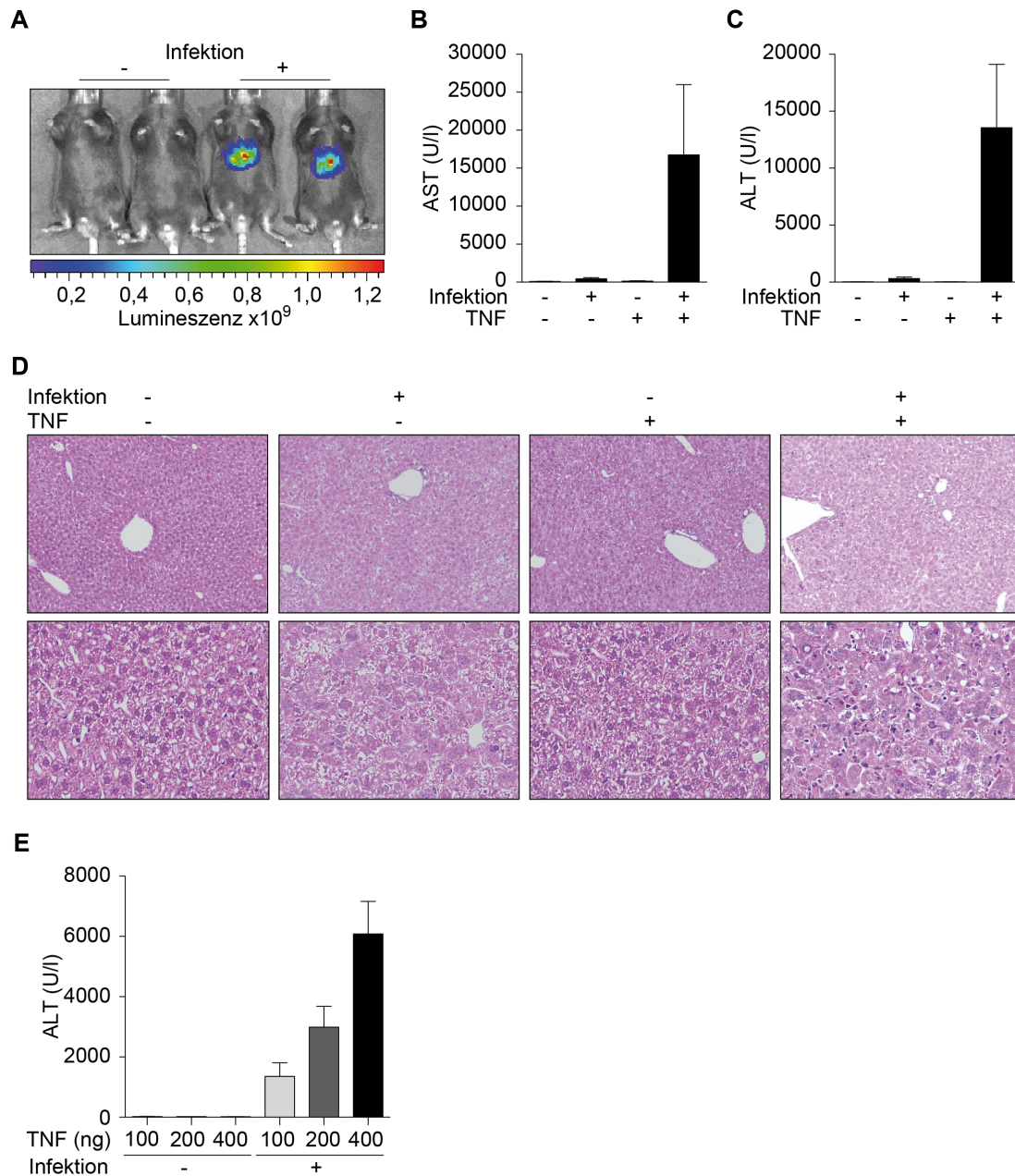
## IV. Ergebnisse

### 1. Eine virale Infektion der Leber führt zur Sensibilisierung für TNFR1-induzierte Leberschädigung.

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) können virusinfizierte Zielzellen über verschiedene Effektormechanismen abtöten. Neben dem Granzym/Perforin- und dem Fas-vermittelten Zelltod spielt die Ausschüttung von Tumornekrosefaktor (TNF) eine wichtige Rolle in der Bekämpfung viraler Infektionen der Leber. So konnten Wohlleber et al. (2012) zeigen, dass von CTL sezerniertes TNF einen apoptotischen Zelltod virusinfizierter Hepatozyten hervorruft.

Um den molekularen Mechanismus hinter dieser nicht-kanonischen CTL-Effektorfunktion zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit auf ein vereinfachtes Tiermodell zurückgegriffen. Dafür wurde die TNF-vermittelte Effektorfunktion der CTL durch eine Injektion von rekombinantem, murinem TNF in infizierte Mäuse simuliert (Wohlleber et al., 2012). Die Infektion der Mäuse erfolgte zwei Tage zuvor mit einem replikationsdefizienten Adenovirus (Ad), welches für die Proteine eGFP, Ovalbumin und Luziferase codiert (AdGOL). Um eine gleichmäßige Effizienz der Infektion in unterschiedlichen Versuchsgruppen zu Grunde legen zu können, wurde 24 h nach Infektion (p.i., post infectionem) eine Biolumineszenzmessung an den Mäusen durchgeführt (**Abbildung 1 A**). Die Biolumineszenz nach Luziferin-Injektion ist von der Menge des viral codierten Enzyms Luziferase abhängig und diente somit als Messgröße für das Ausmaß der Infektion (Stabenow et al., 2010).

Die Konzentration der Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum wurde als Maß für die Leberschädigung verwendet. Die Infektion mit AdGOL oder TNF-Applikation allein bewirkten keine Leberzellschädigung; die Transaminasenaktivität war vergleichbar mit dem basalen Level ohne Behandlung (**Abbildung 1 B, C**). Es zeigte sich jedoch ein deutlicher Anstieg von AST und ALT, wenn virusinfizierten Mäusen TNF appliziert wurde.



**Abbildung 1: Eine Virale Infektion sensibilisiert für TNF-vermittelte Leberschädigung.**

**(A)** *In-vivo*-Biolumineszenzmessung 24 h nach Infektion (p.i.) mit dem für Luziferase codierendem AdGOL ( $1 \times 10^9$  PFU). **(B)** AST- und **(C)** ALT-Aktivität im Serum von uninfizierten (-) Mäusen oder 48 h nach Infektion (+) mit  $1 \times 10^9$  PFU AdGOL (n= 3 Mäuse). Die Messung erfolgte vor (-) und 4 h nach Injektion von 400 ng TNF (+). **(D)** HE-Färbung von PFA-fixiertem Lebergewebe nach Behandlung der Mäuse wie in (B, C). Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte (n=2 Mäuse); die untere Reihe zeigt eine 6x höhere Vergrößerung. **(E)** ALT-Messung 4 h nach Behandlung von infizierten Mäusen ( $5 \times 10^8$  PFU, 48 h p.i.) mit den gekennzeichneten Dosen TNF (n=3 Mäuse). **(B, C, E)** Darstellung von Mittelwert + SD.

## IV. Ergebnisse

Da Serum-Transaminasen nur Biomarker für einen Leberschaden darstellen, wurde das Lebergewebe auch histologisch untersucht. Dabei ließ sich eine Zerstörung des Lebergewebes nach Infektion in Kombination mit TNF erkennen, während Infektion oder TNF allein zu keiner sichtbaren Schädigung führte (**Abbildung 1 D**). Im Rahmen einer antiviralen Immunantwort der Leber korreliert der Leberschaden direkt mit der Anzahl an Virus-spezifischen Immunzellen. Deshalb wurde weiterhin untersucht, ob das Ausmaß des Leberschadens in diesem vereinfachten Modell einer CTL-Effektorfunktion von der Menge des applizierten TNFs abhängt. Es zeigte sich eine klare Abhängigkeit der Serum-Transaminasenaktivität von der Menge an appliziertem TNF (**Abbildung 1 E**). Der Leberschaden stieg in den infizierten Mäusen bis zu einer Dosis von 400 ng stetig an.

Zusammengenommen lässt dies darauf schließen, dass eine virale Infektion mit AdGOL Hepatozyten für eine zytotoxische Wirkung von TNF sensibilisiert und schlussendlich zu einem Leberschaden nach TNF-Applikation führt.

### **1.1. Die TNF-induzierte virale Hepatitis kann durch unterschiedliche Viren hervorgerufen werden.**

Das verwendete Modellvirus AdGOL codiert für eine Kombination verschiedener Transgene (eGFP, Ovalbumin und Luziferase). In den folgenden Versuchen sollte ausgeschlossen werden, dass Transgen-spezifische Effekte an der Sensibilisierung für eine TNF-induzierte virale Hepatitis beteiligt sind.

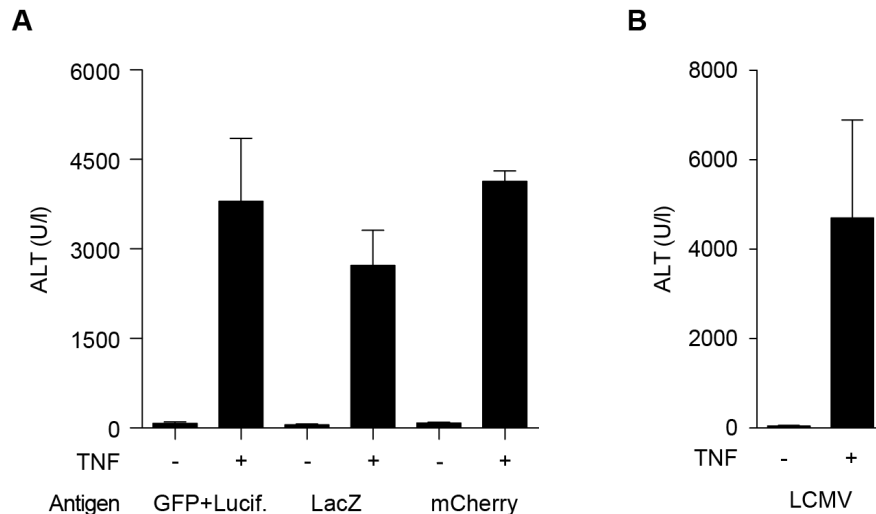
Dafür wurden Mäuse mit Adenoviren (AdGL, AdLacZ, AdmCherry) infiziert, die für verschiedene andere Transgene codieren – eGFP und Luziferase,  $\beta$ -Galactosidase bzw. mCherry. Die Applikation von TNF führte auch hier zu einem Anstieg der Transaminasenaktivität im Serum der Mäuse (**Abbildung 2 A**). Dies demonstriert, dass die Sensibilisierung von virusinfizierten Hepatozyten gegenüber proapoptotischen TNF-Signalen nicht von der Art des exprimierten Transgens abhängig ist.

Bei den verwendeten Adenoviren handelt es sich um replikationsdefiziente, rekombinante DNA-Viren. Durch den Einsatz eines replikationskompetenten negativ-Strang RNA-Virus, dem Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV), sollte untersucht werden, ob die Sensitivierung von Hepatozyten für TNF-



vermittelten Zelltod ein genereller durch virale Infektion induzierter Mechanismus ist. Tatsächlich konnte auch nach Infektion mit LCMV durch TNF-Injektion ein Leberschaden induziert werden (**Abbildung 2 B**).

Es handelt sich bei der Sensibilisierung für die zytotoxische Wirkung von TNF durch eine virale Infektion also um einen Mechanismus, der unabhängig vom viral codierten Transgen ist und auf Viren verschiedener Familien zutrifft.



**Abbildung 2: Induktion einer TNF-vermittelten Hepatitis nach Infektion mit unterschiedlichen Viren.**

**(A)** ALT-Messung 4 h nach TNF-Injektion, 48 h nach Infektion mit  $5 \times 10^8$  PFU verschiedener Adenoviren, die für die gekennzeichneten Transgene codierten. **(B)** ALT-Messung uninifizierter oder LCMV-infizierter ( $1 \times 10^5$  PFU, 48 h p.i.) Mäuse, vor und 4 h nach Injektion von TNF. **(A-B)**  $n=3$  Mäuse, Darstellung von Mittelwert + SD.

## 1.2. Der TNF-induzierte Zelltod infizierter Hepatozyten wird über den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) vermittelt.

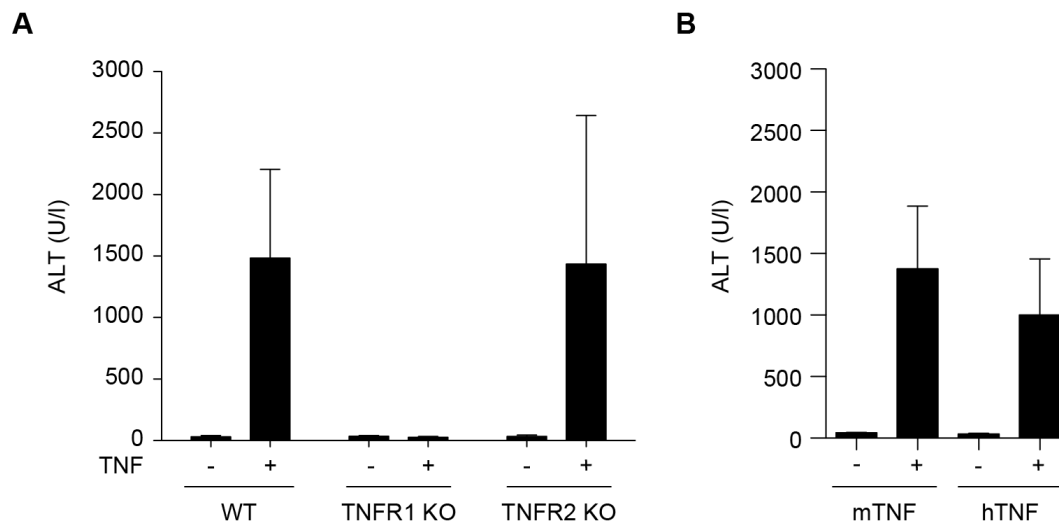
TNF kann an zwei verschiedene TNF-Rezeptoren (TNFR), TNFR1 und TNFR2, binden (Hohmann et al., 1989). Um zu untersuchen, welcher der Rezeptoren bei der TNF-vermittelten viralen Hepatitis involviert ist, wurden Mäuse, denen selektiv TNFR1 bzw. TNFR2 fehlt, infiziert und mit TNF behandelt. Die TNFR2 KO-Mäuse entwickelten einen starken Leberschaden, vergleichbar mit den Wildtyp-Kontrollen (WT). Im Gegensatz dazu konnte in den TNFR1 KO-Mäusen keine Hepatitis ausgelöst werden (**Abbildung 3 A**).

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden zusätzliche Versuche mit rekombinantem humanen TNF (hTNF) durchgeführt. hTNF aktiviert selektiv nur

## IV. Ergebnisse

den murinen TNFR1 (mTNFR1) und nicht mTNFR2 nach Injektion in eine Maus, während das in den sonstigen Experimenten verwendete murine TNF (mTNF) auf beide Rezeptoren wirkt (Lewis et al., 1991). Die Injektion von hTNF in infizierte Mäuse konnte einen Leberschaden induzieren (**Abbildung 3 B**).

Insgesamt demonstriert dies, dass die TNF-induzierte virale Hepatitis über TNFR1 vermittelt wird und TNFR2 keine Rolle spielt.



**Abbildung 3: Analyse der Beteiligung der TNF-Rezeptoren (TNFR) am TNF-vermittelten Zelltod infizierter Hepatozyten.**

**(A)** ALT-Aktivität gemessen im Blut von infizierten ( $5 \times 10^8$  PFU AdGOL) Wildtyp- (WT) bzw. TNFR1 oder TNFR2 knock-out (KO)-Mäusen vor und 4 h nach Injektion von TNF (n=3 Mäuse).

**(B)** ALT-Aktivität von infizierten Mäusen vor und 4 h nach Injektion von je 400 ng murinem (mTNF) oder humanem TNF (hTNF) (n=3 Mäuse). **(A-B)** Darstellung von Mittelwert + SD.

## 2. Die virale Infektion bestimmt eine differentielle Einleitung der TNFR1-abhängigen Signalwege.

Stimulation des TNFR1 kann einerseits durch Aktivierung von NF $\kappa$ B zur Induktion proinflammatorischer und antiapoptitischer Signalwege führen, andererseits durch die Aktivierung von Caspasen apoptotischen Zelltod auslösen (Micheau and Tschopp, 2003). In Abwesenheit einer viralen Infektion wird durch TNF keine Leberschädigung hervorgerufen, wohingegen nach viraler Infektion und TNF-Stimulation ein Leberschaden auftritt (**Abbildung 1**). Dies legt die Vermutung nahe, dass die virale Infektion Veränderungen in der Koordination

der pro- und antiapoptotischen TNFR1-Signalwege verursacht. Aus diesem Grunde wurden im Folgenden die beiden TNFR1-abhängigen Signalwege im Detail untersucht.

### **2.1. TNF führt selektiv in infizierten Hepatozyten zur Induktion von Apoptose.**

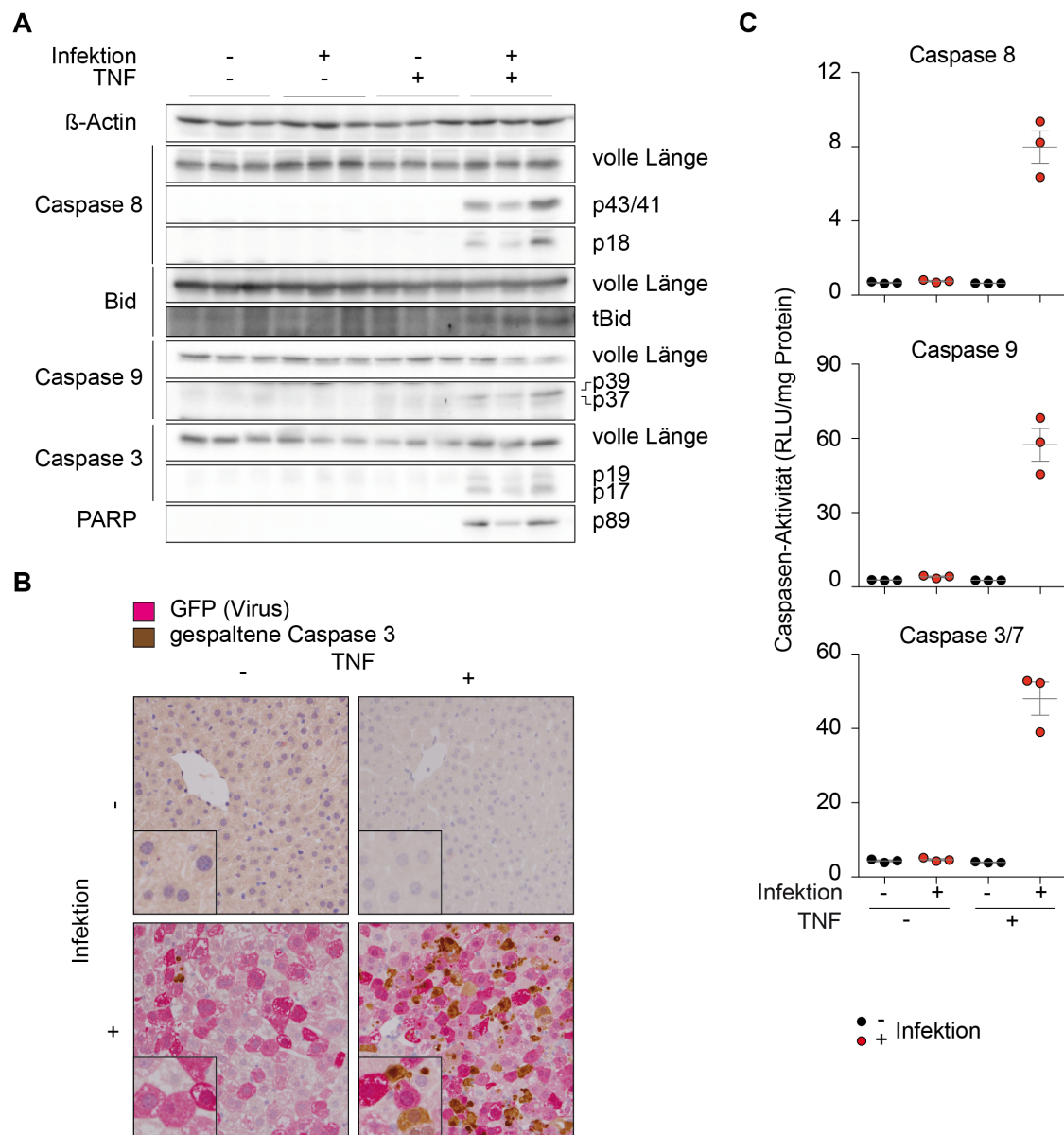
Der TNF-induzierte Leberschaden virusinfizierter Mäuse ist durch eine Aktivierung von Caspase 3 in infizierten Zellen gekennzeichnet (Wohlleber et al., 2012). Da Caspase-Inhibitoren diesen Leberschaden nahezu vollständig verhindern konnten, konnte die Apoptose als Ursache für die Leberschädigung bestätigt werden (Gärtner, 2011). Um den TNFR1-abhängigen Apoptosesignalweg im Detail zu untersuchen, wurde mittels Immunoblot die im Zuge der Apoptose stattfindende Enzymkaskade analysiert, die durch Spaltungen von Proenzymen in ihre aktiven Formen charakterisiert ist.

Die Rezeptor-vermittelte Apoptose wird durch Spaltung der Initiator-Caspase 8 initiiert. In Hepatozyten sind mitochondriale Signale für die Aktivierung von Effektor-Caspasen nötig (Gärtner, 2011; Scaffidi et al., 1998; Yin et al., 1999). Die Brücke zum intrinsischen, mitochondrialen Apoptose-Signalweg bildet hier die Caspase 8-vermittelte Spaltung von Bid zu tBid. tBid ermöglicht durch die Ausschüttung mitochondrialer proapoptotischer Proteine ins Zytoplasma die Aktivierung von Caspase 9 und von Effektor-Caspasen, wie Caspase 3 (Luo et al., 1998).

Die Menge der Proenzyme Caspase 8, Bid, Caspase 9 und Caspase 3 blieb nach Infektion und TNF-Behandlung weitestgehend gleich (**Abbildung 4 A**).

Eine Spaltung von Caspase 8 (p43, p41, p18), Bid (tBid), Caspase 9 (p37, p39), Caspase 3 (p19, p17) und PARP (p89) konnte hingegen ausschließlich nach TNF-Applikation in virusinfizierte Mäuse detektiert werden (**Abbildung 4 A**). Zusätzliche immunhistochemische Analysen der Leber nach TNF-Stimulation zeigten gespaltene Caspase 3 auch auf Einzelzellebene nur in infizierten Hepatozyten und bestätigten die Ergebnisse des Immunoblots (**Abbildung 4 B**).

## IV. Ergebnisse



**Abbildung 4: Untersuchung des Apoptose-Signalweges in der TNF-vermittelten viralen Hepatitis.**

**(A)** Immunoblot von Leberlysaten gegen die gekennzeichneten Proteine, die im Apoptose-Signalweg beteiligt sind. Die Leberentnahme erfolgte an uninfizierten oder infizierten ( $1 \times 10^9$  PFU AdGOL, 48 h p.i.) Mäusen ( $n = 3$  Mäuse), vor und 1 h nach Injektion von 400 ng TNF.  $\beta$ -Actin fungierte als Ladekontrolle. **(B)** Immunhistochemie für gespaltene Caspase 3 (braun) und GFP (rot) an Leberschnitten von uninfizierten und infizierten ( $5 \times 10^8$  PFU AdGOL) Mäusen, behandelt wie in (A). GFP diente als Marker für AdGOL-infizierte Zellen. Es werden repräsentative Ausschnitte gezeigt ( $n = 2$  Mäuse). In den jeweils linken unteren Ecken wird ein Bildausschnitt in doppelter Vergrößerung dargestellt. **(C)** Lumineszenz-basierter Caspase-Aktivitätsassay mit Leberlysaten von Mäusen, behandelt wie in (A). Die Infektion erfolgte mit AdLacZ. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus, dargestellt in relativen Lumineszenz-Units (RLU) mit Mittelwert  $\pm$  SEM.

Um nachzuweisen, dass die Spaltung der Caspasen auch mit ihrer Aktivierung einhergeht, wurde ein Caspasen-Aktivitätsassay durchgeführt, der auf der Spaltung und Aktivierung eines Luziferin-Derivates durch Caspasen basiert. Dieser zeigte, dass auch die Aktivität der Caspasen 8, 9 und 3/7 einzig nach TNF-Injektion infizierter Tiere im Vergleich zu unbehandelten Mäusen erhöht war **(Abbildung 4 C)**.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der proapoptotische TNFR1-Signalweg in uninfizierten Hepatozyten nicht initiiert wurde bzw. schon oberhalb der Initiator-Caspase 8-Aktivierung blockiert war. Nur in Kombination mit einer viralen Infektion konnte TNF eine Caspase 8-Aktivierung und somit die Einleitung der apoptotischen Kaskade bewirken.

## **2.2. TNF initiiert antiapoptotische / proinflammatorische Signaltransduktion in uninfizierten und ebenso in infizierten Hepatozyten.**

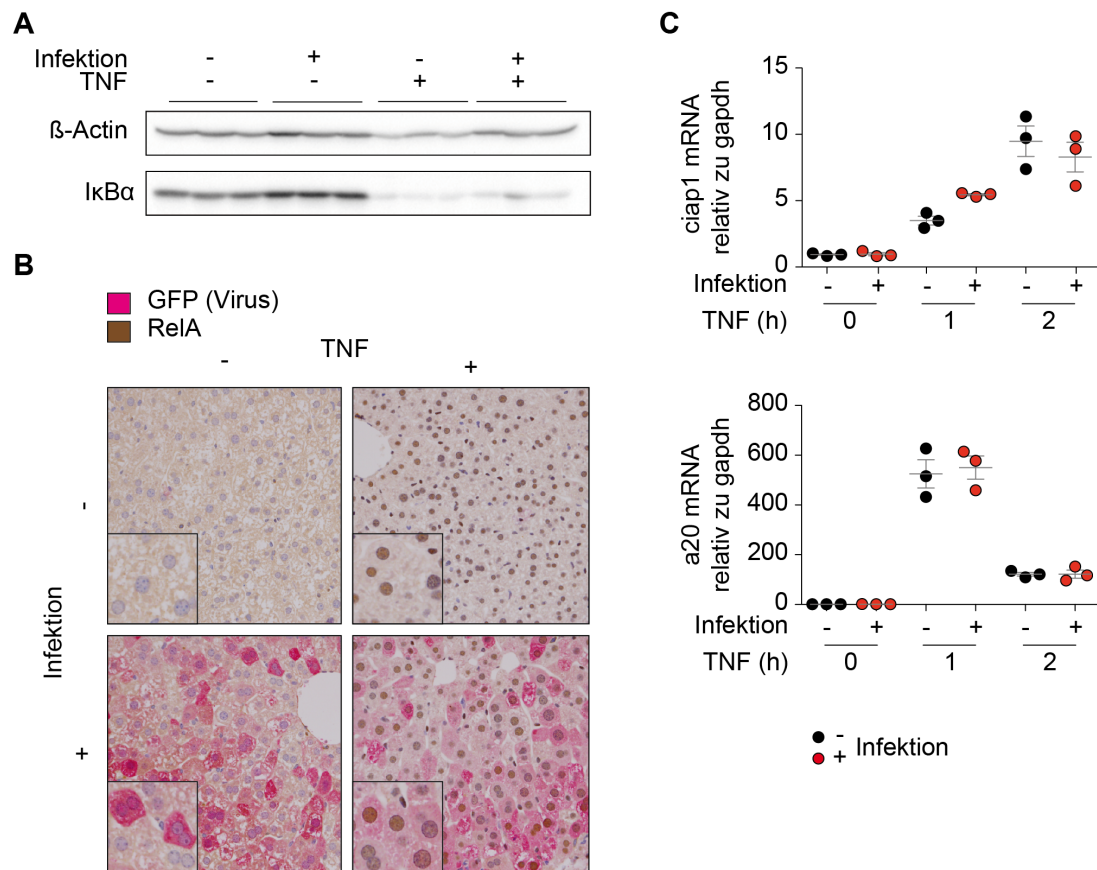
Es ist bekannt, dass eine Inhibition der TNFR1-abhängigen NFκB-Signaltransduktion - und der damit verbundenen Expression antiapoptitischer Gene - einen apoptotischen Ausgang der TNFR1-Signaltransduktion begünstigt (Kreuz et al., 2001; Van Antwerp et al., 1996). Dementsprechend sollte hier untersucht werden, ob eine virale Infektion der Hepatozyten eine Einschränkung der NFκB-Aktivierung bewirkt.

Der NFκB-Inhibitor-α (IκBα) bindet NFκB im Zytoplasma und verhindert dadurch dessen Translokation in den Kern. Im Zuge der kanonischen NFκB-Aktivierung über den TNFR1 wird IκBα phosphoryliert und proteasomal degradiert (Wajant and Scheurich, 2011). Dies erlaubt die Translokation von freiem NFκB in den Zellkern und die Transkription von NFκB-abhängigen Genen. Somit kann die Aktivierung des NFκB-Signalweges auf verschiedenen Ebenen untersucht werden.

Im ersten Schritt wurde die Degradation von IκBα mittels Immunoblot nachgewiesen. Erstaunlicherweise ist im Lebergewebe infizierter Mäuse bereits 15 min nach TNF-Gabe die gleiche Reduktion von IκBα zu beobachten wie im Lebergewebe uninfizierter, TNF-behandelter Mäuse **(Abbildung 5 A)**.

Zusätzlich wurden immunhistochemische Färbungen der NFκB-Untereinheit RelA in Leberschnitten nicht infizierter und infizierter Mäuse 45 min nach TNF-

## IV. Ergebnisse



**Abbildung 5: Untersuchung der TNF-induzierten NFκB-Aktivierung nach viraler Infektion.**

**(A)** Immunoblot von Leberlysaten gegen IκBα, das im Zuge der kanonischen NFκB-Aktivierung abgebaut wird. Die Leberentnahme erfolgte an uninanzierten und infizierten ( $1 \times 10^9$  PFU AdGOL, 48 h p.i.) Mäusen, vor und 15 min nach Injektion von TNF ( $n=3$  Mäuse). **(B)** Immunhistochemie für die NFκB-Untereinheit RelA (braun) und GFP (rot) an Leberschnitten von Mäusen infiziert mit  $5 \times 10^8$  PFU AdGOL wie in (A), vor und 45 min nach TNF-Injektion. GFP diente als Marker für AdGOL-infizierte Zellen. Es werden repräsentative Ausschnitte gezeigt ( $n=2$  Mäuse). In den jeweils linken unteren Ecken wird ein Bildausschnitt in doppelter Vergrößerung dargestellt. **(C)** Bestimmung der mRNA-Level von a20 und ciap1 normalisiert zu gapdh mittels qRT-PCR von Lebergewebe. Leberentnahme nach Infektion wie in (A); ohne (0), 1 h und 2 h (1 bzw. 2) nach TNF-Injektion. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus, dargestellt mit Mittelwert  $\pm$  SEM.

Gabe angefertigt. Infizierte Zellen wurden durch eine Färbung des viral codierten GFPs kenntlich gemacht (rot). RelA (braun) zeigte in unstimulierten Hepatozyten (ohne TNF-Gabe) eine zytoplasmatische Lokalisation (**Abbildung 5 B**). Jedoch ist nach TNF-Stimulation in uninanzierten und infizierten Zellen eine nukleäre Translokation von RelA in fast allen Zellen zu beobachten, was konsistent mit dem Abbau von IκB ist.

Letztendlich wurde auch die transkriptionelle Aktivität von NF $\kappa$ B analysiert. Dazu wurde das mRNA-Level der NF $\kappa$ B-Zielgene *ciap1* und *a20* (Krikos et al., 1992; Wang et al., 1998) im Lebergewebe eine und zwei Stunden nach TNF-Stimulation mittels quantitativer reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) bestimmt. *ciap1* und *a20* zeigten nach Stimulation einen Anstieg mit unterschiedlicher Kinetik, wobei das *ciap1*-Level zwei Stunden nach TNF noch weiter zunahm, während *a20* nach einer Stunde ein Maximum zeigte (**Abbildung 5 C**). Auch in der Expression dieser Gene ist kein Unterschied zwischen infiziertem und uninfiziertem Lebergewebe auszumachen.

Alle drei untersuchten Parameter zeigen, dass TNF gleichermaßen in infizierten und uninfizierten Hepatozyten proinflammatorische TNFR1-Signaltransduktion stimuliert und somit die virale Infektion keine Einschränkung der NF $\kappa$ B-Aktivierung bewirkt.

### **2.3. Der Zeitverlauf der TNFR1-Signaltransduktion in uninfizierten und infizierten Mäusen ist gleich.**

Die vorigen Experimente zeigen, dass TNF in infizierten Mäusen sowohl pro- als auch antiapoptotische Signale induziert. Als Resultat dieser gegensätzlichen TNF-induzierten Signale zeigt sich jedoch der Zelltod infizierter Hepatozyten. Dies könnte sich daraus ergeben, dass die Caspasen-Aktivierung den antiapoptotischen NF $\kappa$ B-Signalen vorausgeht. Im nächsten Schritt wurde deshalb die Caspasen- und NF $\kappa$ B-Aktivierung im Zeitverlauf nach TNF-Injektion untersucht. Auch bei dieser detaillierten Betrachtung per Immunoblot ergibt sich kein Unterschied zwischen den uninfizierten und infizierten Tieren bezüglich der NF $\kappa$ B-Signaltransduktion: 15 min nach TNF-Injektion zeigte sich in beiden Fällen bereits eine maximale, fast komplette Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  (**Abbildung 6 A**). Entsprechend kann zu diesem Zeitpunkt kaum phosphoryliertes I $\kappa$ B $\alpha$  (P-I $\kappa$ B $\alpha$ ) detektiert werden. 30 und 45 min nach Stimulation, wenn die totale I $\kappa$ B $\alpha$ -Menge stetig wieder zunahm, war auch mehr P-I $\kappa$ B $\alpha$  zu erkennen. 1 h nach TNF hatte die I $\kappa$ B $\alpha$ -Menge das Ausgangsniveau ohne Stimulation noch nicht wieder erreicht.

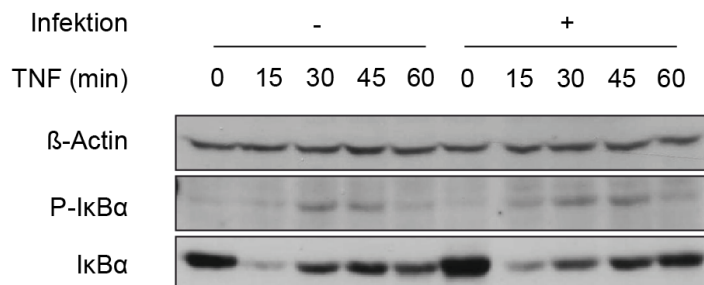
Die Spaltung von Caspasen konnte nach TNF-Stimulation wie erwartet nur in infizierten Tieren festgestellt werden (**Abbildung 6 B**). Während 15 und 30 min

## IV. Ergebnisse

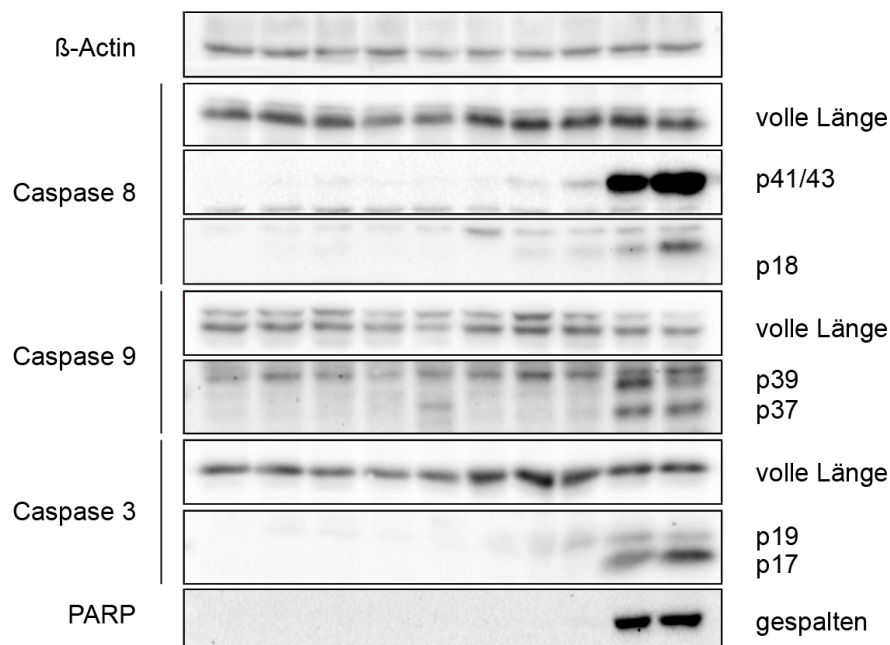
nach TNF die Caspase 8-Spaltfragmente noch sehr schwach zu detektieren waren, war 45 und 60 min nach TNF ein deutlicher Anstieg auszumachen. Spaltfragmente von Caspase 9, Caspase 3 und PARP waren erstmalig nach 45 min zu erkennen.

Insgesamt betrachtet, widersprechen diese Ergebnisse der Vermutung, dass die Caspasen-Aktivierung der NF $\kappa$ B-Aktivierung vorausgeht. Vielmehr war zu beobachten, dass die Aktivierung von NF $\kappa$ B nach TNFR1-Stimulation sehr schnell erfolgt, während die Caspasen-Aktivierung langsamer verläuft und durch eine graduelle Steigerung ausgezeichnet ist.

**A**



**B**



**Abbildung 6: Betrachtung der TNFR1-Signaltransduktion im Zeitverlauf.**

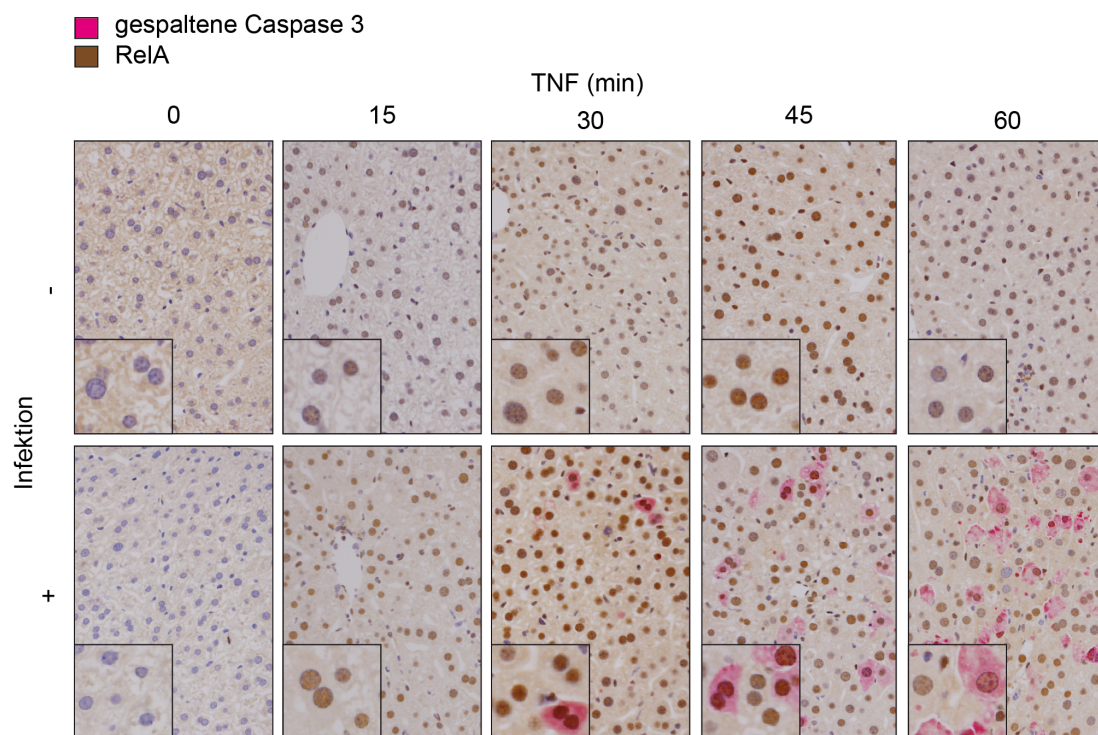
**(A-B)** Immunoblot von vereinigten Leberlysaten (n=3 Mäuse) gegen Marker für NF $\kappa$ B-Aktivierung **(A)** und für proapoptotische Signaltransduktion **(B)**. Die Leberentnahme erfolgte an uninfizierten und infizierten ( $1 \times 10^9$  PFU AdGOL, 48 h p.i.) Mäusen zu den indizierten Zeitpunkten nach Injektion von TNF.



#### 2.4. Verschiedene TNFR1-Signaltransduktionswege laufen parallel in einer Zelle ab.

**Abbildung 4 B** zeigt, dass nur einzelne der infizierten Hepatozyten nach TNF-Applikation positiv für gesplante Caspase 3 waren. Gleichzeitig war die RelA-Translokation ungleichmäßig stark und nicht in allen Hepatozyten zu beobachten (**Abbildung 5 B**).

Entsprechend stellt sich die Frage, ob beide Ereignisse parallel im selben Hepatozyten ablaufen oder ob Caspase 3-Aktivierung ausschließlich in genau den Hepatozyten erfolgt, in denen die RelA-Translokation ausbleibt oder nur in geringem Maße stattfindet.



**Abbildung 7: Kombinierte Analyse der TNF-abhängigen Caspase- und NFκB-Aktivierung auf Einzelzellebene.**

Immunhistochemie für die NFκB-Untereinheit RelA (braun) und gesplante Caspase 3 (rot) an Leberschnitten von uninfizierten und infizierten ( $5 \times 10^8$  PFU AdGOL, 48 h p.i.) Mäusen zu den indizierten Zeitpunkten nach TNF-Injektion. Es werden repräsentative Ausschnitte gezeigt (n=2 Mäuse). In den jeweils linken unteren Ecken wird ein Bildausschnitt in doppelter Vergrößerung dargestellt.

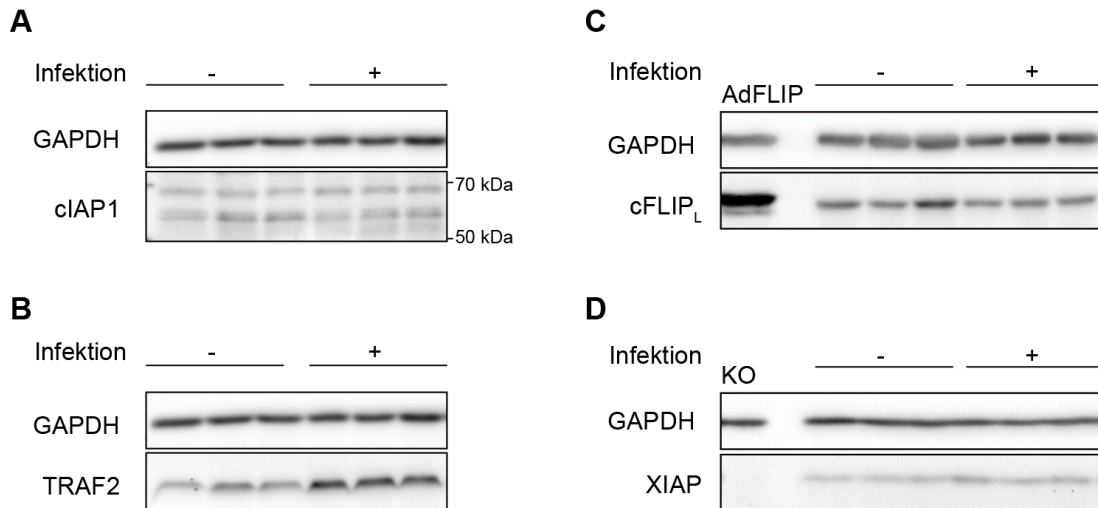
#### IV. Ergebnisse

Um diese Frage zu beantworten, wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung von RelA (braun) und gespaltener Caspase 3 (rot) angefertigt. Es ist zu erkennen, dass gespaltene Caspase 3 und eine starke nukleäre Färbung für RelA in der selben Zelle auftraten (**Abbildung 7**). Da NF $\kappa$ B die Transkription antiapoptotischer Gene initiiert, lässt sich schlussfolgern, dass antiapoptotische und proapoptotische TNF-vermittelte Signaltransduktion parallel in einer Zelle ablaufen.

### 3. Die Sensibilisierung für TNF-vermittelte Apoptose nach viraler Infektion basiert nicht auf einer Reduktion von antiapoptotischen Schlüsselproteinen.

Diverse antiapoptotische Proteine regulieren auf verschiedenen Ebenen den proapoptotischen TNFR1-Signalweg. Da nach viraler Infektion die Einleitung des proapoptotischen Signalweges begünstigt wird, liegt es nahe, zu überprüfen, ob die Expression von antiapoptotischen Schlüsselproteinen nach viraler Infektion reduziert ist.

Die Kontrolle über die sequentielle Bildung der TNFR-Komplexe unterliegt Ubiquitinligasen wie cIAP1 und 2 (Haas et al., 2009). Sie fördern die NF $\kappa$ B-Aktivierung durch Komplex I, während sie die Einleitung der Apoptose inhibieren (Varfolomeev et al., 2008). So wurde ein Verlust von cIAP1 und 2 mit der Bildung von Komplex II und der Induktion von Apoptose in Verbindung gebracht (Petersen et al., 2007; Varfolomeev et al., 2007; Wang et al., 2008). **Abbildung 8 A** zeigt die Expression von cIAP1 in uninfizierten Lebern und 48 h nach Infektion mittels Immunoblot. Das 62-70 kDa große Protein war nach Infektion in seiner Expression nicht vermindert. In Übereinstimmung damit konnte bereits in **Abbildung 5 C** gezeigt werden, dass die mRNA-Menge von ciap1 durch eine virale Infektion nicht beeinflusst wurde.



**Abbildung 8: Expression antiapoptotischer Schlüsselproteine nach viraler Infektion.**

**(A-D)** Immunoblot mit Leberlysaten von uninfizierten und infizierten ( $1 \times 10^9$  PFU AdGOL, 48 h p.i.) Mäusen gegen die Proteine cIAP1 **(A)**, TRAF2 **(B)**, cFLIP<sub>L</sub> **(C)** und XIAP **(D)**. GAPDH diente jeweils als Ladekontrolle. Als Kontrolle für cFLIP wurde eine Probe mit adenoviral überexprimiertem cFLIP (AdFLIP) und als Kontrolle für XIAP eine Probe einer XIAP KO-Maus verwendet.

TRAF2 ist als Adaptermolekül für die Rekrutierung und Stabilisierung von cIAP1 und cIAP2 verantwortlich. Entsprechend wurde auch das Fehlen von TRAF2 mit erhöhtem Aufkommen von Apoptose assoziiert (Csomos et al., 2009; Tada et al., 2001; Vince et al., 2009). Im Immunoblot war allerdings ein Anstieg von TRAF2 nach Infektion zu erkennen **(Abbildung 8 B)**, was einer Förderung des apoptotischen Signalweges vielmehr widerspricht.

Des Weiteren wurde die Auswirkung einer viralen Infektion auf das Expressionsniveau der zellulären Caspase-Inhibitoren cFLIP und XIAP untersucht. cFLIP inhibiert die Aktivierung von Caspase 8 im Komplex II (Micheau and Tschopp, 2003). So können Transkriptions- oder Translationsinhibitoren, welche die NFκB-abhängige Expression von cFLIP vermindern, die Einleitung von Apoptose nach TNF-Stimulation begünstigen (Kreuz et al., 2001). XIAP greift weiter distal im Apoptose-Signalweg ein, wo es die Caspasen 3, 7 und 9 direkt inhibieren kann (Eckelman et al., 2006; Scott et al., 2005; Shiozaki et al., 2003). Immunoblots zeigen, dass die Mengen von cFLIP<sub>L</sub>, einer Spleiß-Isoform von cFLIP, und XIAP nach Infektion konstant blieben **(Abbildung 8 C und D)**.

Insgesamt waren die Proteinmengen der untersuchten antiapoptotischen Proteine nach viraler Infektion nicht vermindert.

#### IV. Ergebnisse

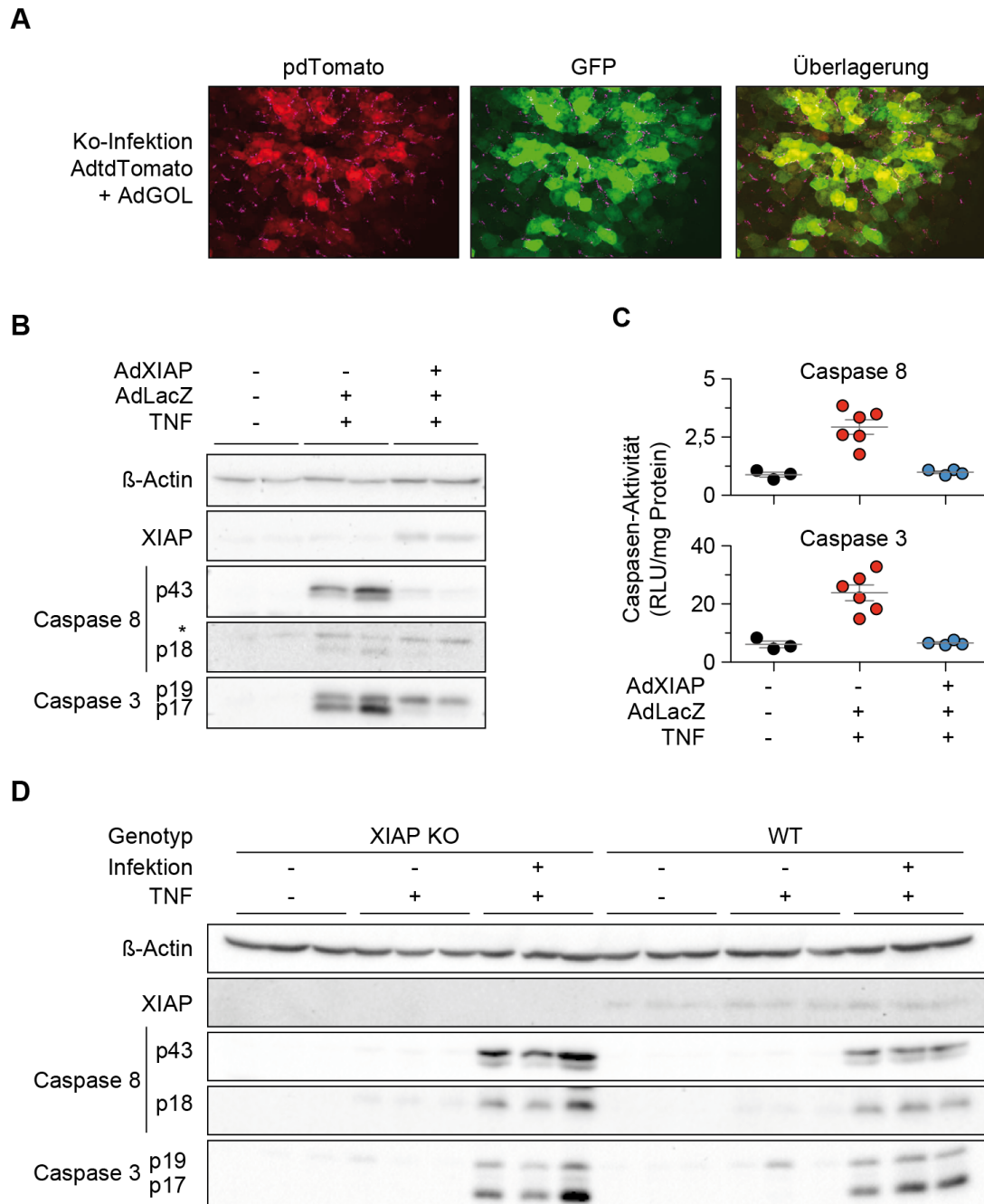
Durch die direkte Hemmung von Effektor-Caspasen hat XIAP ein großes Potential zur Inhibition von Apoptose. Die Beeinflussung von Apoptose durch Manipulation der XIAP-Menge steht deshalb im Fokus aktueller Studien (Obexer and Ausserlechner, 2014).

Im folgenden sollte untersucht werden, ob durch ektopische Überexpression von XIAP eine Inhibition der TNF-induzierten viralen Hepatitis erreicht werden könne. Dafür wurde ein Adenovirus verwendet, das für XIAP unter der Kontrolle des CMV-Promotors codiert (AdXIAP). Dieses wurde Mäusen in einer Ko-Infektion zusammen mit AdLacZ injiziert.

Durch eine Ko-Infektion wird erreicht, dass einzelne Hepatozyten mit den verschiedenen Viren gleichzeitig infiziert werden. Dies wurde beispielhaft für zwei Adenoviren, die für unterschiedliche Fluoreszenz-Proteine codieren, gezeigt (**Abbildung 9 A**).

Die Überexpression von XIAP durch AdXIAP zeigte sich in einer erhöhten XIAP-Proteinmenge im Immunoblot (**Abbildung 9 B**). Wie erwartet führte die TNF-Behandlung von AdLacZ-infizierten Mäusen zur Spaltung und Aktivierung der Caspasen 8 und 3. Die gleichzeitige Infektion mit nur  $1 \times 10^8$  PFU AdXIAP schützte jedoch vor der durch  $5 \times 10^8$  PFU AdLacZ + TNF verursachten Spaltung von Caspase 8 zu p43 und p18. Die Spaltung von Caspase 3 in das aktive p17-Fragment wurde ebenfalls unterbunden, während die Spaltung zum p19-Fragment noch zu beobachten war (**Abbildung 9 B**). Folglich inhibierte die Ko-Infektion mit AdXIAP vollständig die Aktivierung der Caspase 3 und 8 (**Abbildung 9 C**). Das ist überraschend, denn nur für Caspase 3, 7 und 9 ist eine direkte Inhibition durch XIAP bereits bekannt.

Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob eine Inhibition oder Deletion von XIAP ausreichend ist, um eine Sensibilisierung der Hepatozyten für TNF-induzierten Zelltod – in Abwesenheit von viraler Infektion – zu bewirken. Um dies zu klären, wurden XIAP KO-Mäuse verwendet. XIAP KO-Mäuse zeigten nach TNF-Applikation allein allerdings keine Spaltung von Caspasen (**Abbildung 9 D**).



**Abbildung 9: Einfluss einer Manipulation der XIAP-Expression auf die TNF-induzierte Caspasen-Aktivierung.**

**(A)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe 48 h nach Ko-Infektion mit je  $5 \times 10^8$  PFU AdtdTomato und AdGOL. Das Fluoreszenzsignal der viral codierten Proteine wird in rot (tdTomato) und grün (eGFP) dargestellt, eine Überlagerung in gelb. **(B)** Immunoblot mit Leberlysaten von WT-Mäusen 48 h nach Infektion mit  $5 \times 10^8$  PFU AdLacZ bzw. Ko-Infektion mit  $1 \times 10^8$  PFU AdXIAP, 1 h nach TNF-Injektion wie gekennzeichnet. \* unspezifische Bande. β-Actin diente als Ladekontrolle. **(C)** Lumineszenz-basierter Caspase-Aktivitätsassay mit Leberlysaten analog zu (B). Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus, dargestellt mit Mittelwert  $\pm$  SEM. **(D)** Immunoblot mit Leberlysaten von WT- und XIAP KO-Mäusen. Die Leberentnahme erfolgte 1 h nach TNF-Injektion in uninfizierte und infizierte ( $5 \times 10^8$  PFU AdLacZ, 48 h p.i.) Mäuse. β-Actin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Sensibilisierung der Hepatozyten für TNF-vermittelte Apoptose nicht durch einen Einfluss der viralen Infektion auf die Proteinmengen von cIAP, TRAF2, FLIP und XIAP erklärt werden kann. Obwohl eine virale Überexpression von XIAP zur Inhibition der Caspasen-Aktivität führte, war dessen Deletion nicht ausreichend, um die Caspasen-Aktivierung durch TNF zu bewirken.

### **4. Hepatozyten reagieren mit der Induktion von Stress-Antworten auf eine virale Infektion.**

#### **4.1. Die Sensibilisierung für TNF-vermittelten Zelltod ist unabhängig von klassischen innate Immunrezeptoren.**

In den bisherigen Untersuchungen wurden die Auswirkungen der viralen Infektion auf die TNF-Signaltransduktion in Hepatozyten analysiert. Der Sensibilisierung für die proapoptotische TNF-Signaltransduktion durch die virale Infektion muss eine Erkennung des Virus durch die Zelle zu Grunde liegen.

Zellen detektieren Pathogene anhand von hochkonservierten molekularen Merkmalen über Strukturerkennungs-Rezeptoren (PRR). Dazu gehören membrangebundene PRR, die Toll-like-Rezeptoren (TLR), sowie zytosolische Nukleinsäure-Sensoren (Wu and Chen, 2014).

Auch Hepatozyten exprimieren eine Vielzahl von PRR, die unter anderem virale Strukturen, wie Nukleinsäuren oder Proteine, erkennen können (Broering et al., 2011; Petrusek et al., 2013; Wu and Chen, 2014). Es wäre also möglich, dass eine Erkennung der Viren über PRR die Sensibilisierung der Hepatozyten hervorruft. Um dies zu untersuchen, wurden transgene Mäuse verwendet, denen PRR oder Schlüsselkomponenten in deren Signalwegen fehlen.

Die TLR-Signaltransduktion ist abhängig von den Adaptermolekülen TRIF<sup>65</sup> und MyD88<sup>66</sup> (Broering et al., 2011). TRIF und MyD88 knockout (KO) -Mäuse zeigten nach Infektion und TNF-Applikation einen ALT-Anstieg vergleichbar mit den

---

<sup>65</sup> engl.: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

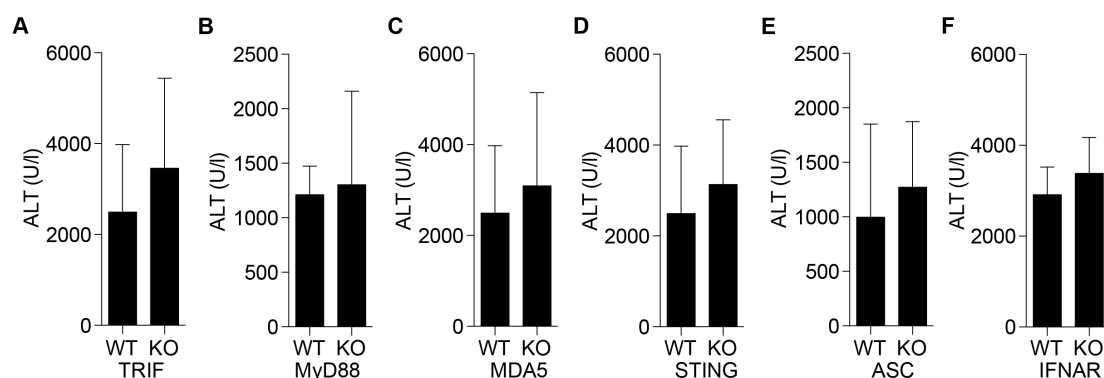
<sup>66</sup> engl.: myeloid differentiation primary response 88

WT-Kontrollen (**Abbildung 10 A, B**), sodass eine Rolle von TLR ausgeschlossen werden kann.

Neben TLR umfassen die PRR auch zytosolische Nukleinsäure-Sensoren, zu denen STING und MDA-5 gehören (Wu and Chen, 2014). Deren Fehlen führt ebenfalls zu keiner Reduktion des Leberschadens (**Abbildung 10 C, D**).

Die Stimulation von PRR bewirkt mittels transkriptioneller Regulation von inflammatorischen Zytokinen, wie Typ-I Interferonen (IFN), oder durch Aktivierung von Caspase 1 in einem als Inflammasom bezeichneten Multiproteinkomplexes die Einleitung antimikrobieller und -viraler Antworten. Darüber hinaus kann Caspase-1 eine als Pyroptose bezeichnete Zelltodform einleiten (Wu and Chen, 2014). Um die Beteiligung dieser PRR-Effektorfunktionen auszuschließen, wurden KO-Mäuse für den Typ-I IFN-Rezeptor (IFNAR) und für ASC, einen essentiellen Bestandteil des Inflammasoms, infiziert und mit TNF behandelt. Auch IFNAR und ASC KO-Mäuse entwickelten eine Hepatitis vergleichbar mit den WT-Kontrollen (**Abbildung 10 E, F**).

Insgesamt konnte also in allen untersuchten PRR-assozierten KO-Mäusen eine virale, TNF-vermittelte Leberschädigung hervorgerufen werden. Entsprechend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Erkennung struktureller Komponenten des Virus über PRR nicht notwendig ist, um eine Sensibilisierung der Hepatozyten zu bedingen.



**Abbildung 10: Untersuchung der Rolle von PRR in der TNF-vermittelten viralen Hepatitis.** (A-F) ALT-Aktivitätsmessung im Blut von WT-Kontrollen und Mäusen mit gekennzeichnetem KO (n=3 Mäuse). Blutentnahme 4 h nach TNF-Injektion, 48 h nach Infektion mit  $5 \times 10^8$  PFU AdGOL. Darstellung von Mittelwert + SD.

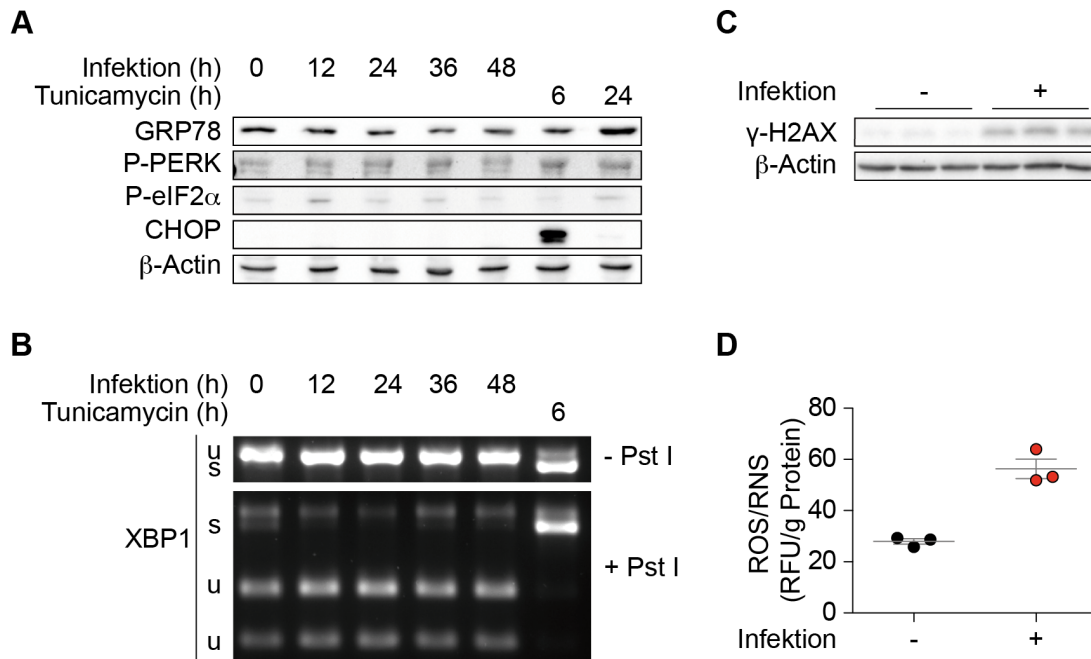
### 4.2. Die virale Infektion geht mit der Induktion zellulären Stresses einher.

Im vorigen Abschnitt konnte keine Beteiligung von PRR an der Sensibilisierung für eine TNF-vermittelte virale Hepatitis nachgewiesen werden. Da diese Sensibilisierung durch sehr unterschiedliche Viren ausgelöst werden kann (siehe Abschnitt IV.1.1), liegt ihr wahrscheinlich ein universeller Effekt zu Grunde. Im Gegensatz zur gezielten Erkennung von Pathogenen durch PRR löst eine unspezifische Störung der zellulären Homöostase, mit der virale Infektionen häufig einher gehen, eine generelle Stress-Antwort in den infizierten Zellen aus. Diese Stress-Antwort sind Signale, die der Wiederherstellung der Homöostase oder - bei schweren Störungen - der Einleitung von Zelltod dienen sollen (Galluzzi et al., 2012a). Im folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob eine adenovirale Infektion der Leber mit zellulärem Stress bzw. Stress-Antworten einhergeht.

Virale Infektionen können wegen der massiven Produktion viraler Proteine einen Auslöser für ER-Stress darstellen (He, 2006). Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten Adenovirus ist durch die Deletion der E1- und E3-Region die Produktion viraler Proteine extrem herabgesetzt (Danthinne and Imperiale, 2000). Trotzdem ist eine Induktion von ER-Stress durch eine extensive Produktion der adenoviral codierten Transgene wie eGFP/Ovalbumin/Luziferin (im Falle von AdGOL) bzw.  $\beta$ -Galactosidase (im Falle von AdLacZ) denkbar, da diese unter der Kontrolle des starken CMV-Promoters stehen.

Um zu überprüfen, ob die virale Infektion ER-Stress induziert, wurden verschiedene ER-Stress-Marker mittels Immunoblot untersucht. PERK ist an der Initiation der ER-Stress-Antwort beteiligt. Die Hochregulation des Chaperons GRP78 und eine Inhibition der Translation durch Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  (P-eIF2 $\alpha$ ) dienen der Adaption an ER-Stress, während der Transkriptionsfaktor CHOP Apoptose begünstigt (Malhi and Kaufman, 2011). Als Positiv-Kontrolle für ER-Stress wurden Mäuse mit Tunicamycin behandelt, einem Inhibitor der Protein-Glykosylierung (Kondoh et al., 2004). Im Vergleich zur Tunicamycin-Behandlung war durch Infektion mit AdGOL keine eindeutige Erhöhung der ER-Stress-Marker zu erkennen (**Abbildung 11 A**).





**Abbildung 11: Induktion zellulären Stresses durch eine virale Infektion.**

**(A-B)** Leberentnahme von unbehandelten Mäusen (0) und zu den gekennzeichneten Zeitpunkten nach Infektion mit  $1 \times 10^9$  PFU AdGOL oder nach Injektion von Tunicamycin. (n=3 Mäuse, gezeigt ist exemplarisch nur n=1). **(A)** Immunoblot mit Leberlysaten für verschiedene ER-Stress-Marker. **(B)** mRNA-Isolation aus Lebergewebe und anschließende cDNA-Synthese und PCR mit Primern gegen XBP1. Gelelektrophorese ohne (oben) und mit (unten) vorherigem Verdau des PCR-Produkts durch Pst I. Ungespleißte (u) und alternativ gespleißte (s) Formen von XBP1 sind anhand ihrer Größe und der Schnittstelle für Pst I zu unterscheiden. **(C)** Immunoblot mit Leberlysaten uninfizierter und infizierter ( $1 \times 10^9$  PFU AdGOL, 48 h p.i.) Mäuse. **(D)** Messung freier ROS/RNS mit Fluoreszenz-basiertem Assay anhand von relativen Fluoreszenz-Units (RFU) in Leberlysaten uninfizierter und infizierter ( $1 \times 10^9$  PFU AdLacZ, 48 h p.i.) Mäuse. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus, dargestellt mit Mittelwert  $\pm$  SEM.

Um die im Immunoblot gewonnenen Ergebnisse durch eine weitere Methode zu bestätigen, sollte gespleißtes XBP1 (sXBP1), eine unter ER-Stress durch alternatives Spleißen erzeugte Isoform des Transkriptionsfaktors XBP1, auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Die alternativ gespleißte mRNA (s) konnte aufgrund ihrer geringeren Größe und der fehlenden Schnittstelle für das Restriktionsenzym Pst1 von der ungespleißten Variante (u) unterschieden werden. Innerhalb von 48 h nach Infektion konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte sXBP1 mRNA nachgewiesen werden (**Abbildung 11 B**).

Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Infektion mit AdGOL keinen ER-Stress induziert. Viele Viren, inklusive Adenoviren, sind als

#### IV. Ergebnisse

Auslöser einer DNA-Schadensantwort (DDR<sup>67</sup>) bekannt (Nichols et al., 2009; Stracker et al., 2002). Die DDR ist eine zelluläre Stress-Antwort auf Schädigungen der DNA oder Fehler bei ihrer Replikation (Luftig, 2014).

Um die DDR nach Infektion mit AdGOL zu untersuchen, wurde als Marker die Phosphorylierung von H2AX zu  $\gamma$ -H2AX mittels Immunoblot erfasst (Luftig, 2014). Nach Infektion stieg die Menge an  $\gamma$ -H2AX an (**Abbildung 11 C**). Dies lässt darauf schließen, dass die Infektion mit AdGOL in der Leber eine DDR auslöst.

Auch oxidativer Stress wurde im Rahmen vieler viraler Infektionen beobachtet (Kroemer et al., 2007; Loguercio and Federico, 2003; Valyi-Nagy and Dermody, 2005).

Deshalb sollte die Entstehung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (ROS/RNS) nach adenoviraler Infektion in der Leber untersucht werden. Dazu wurden mit Hilfe eines Fluoreszenz-basierten Assays freie ROS/RNS im Leberlysate detektiert. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der freien ROS/RNS um etwa das Doppelte nach Infektion (**Abbildung 11 D**). Die adenovirale Infektion führt also oxidativen Stress mit sich.

Die hier gezeigten Versuche weisen darauf hin, dass die virale Infektion zur Induktion von verschiedenen zellulären Stress-Antworten führt, die eine Sensibilisierung der infizierten Hepatozyten für TNF-vermittelten Zelltod hervorrufen könnten. Während kein ER-Stress detektiert werden konnte, löste die virale Infektion sowohl eine DNA-Schadensantwort als auch oxidativen Stress aus.

---

<sup>67</sup> engl.: DNA damage response

### 4.3. Die virale Infektion führt zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie.

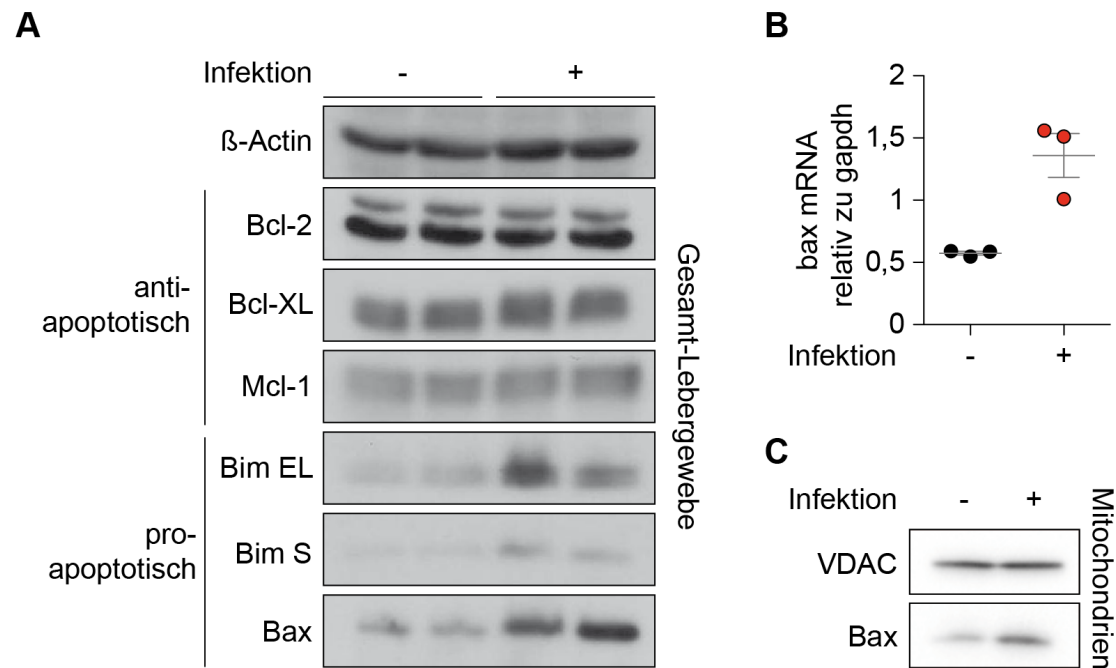
Stress-Antworten werden am Mitochondrium integriert. Dazu reguliert zellulärer Stress die Expression, Verfügbarkeit und Aktivität von Proteinen der Bcl-2-Familie (Galluzzi et al., 2014; Happonen et al., 2012). Die pro- bzw. antiapoptotisch wirkenden Bcl-2-Proteine interagieren miteinander und sind so zur Kontrolle der Mitochondrienpermeabilität in einem empfindlichen Gleichgewicht. Jegliche Änderung in der Menge einzelner Bcl-2-Proteine kann dieses Gleichgewicht stören und so pro- bzw. antiapoptotisch wirken (Youle and Strasser, 2008).

Deshalb wurde per Immunoblot die Expression verschiedener Bcl-2-Proteine im Lebergewebe uninfizierter und infizierter Mäuse verglichen. Während die antiapoptotischen Mitglieder Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1 unverändert blieben, zeigte sich bei den proapoptotischen Proteinen Bax und Bim ein deutlicher Anstieg nach Infektion (**Abbildung 12 A**).

Der durch Infektion herbeigeführte Anstieg von Bax konnte auch auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR nachgewiesen werden (**Abbildung 12 B**). Dies lässt vermuten, dass dem Anstieg an Bax eine erhöhte Transkription zu Grunde liegt.

Jedoch wird Bax auch posttranskriptionell reguliert: Bax liegt im inaktiven Zustand vorrangig zytoplasmatisch vor, vollzieht im Zuge seiner Aktivierung aber eine Translokation in die mitochondriale Außenmembran (Ghibelli and Diederich, 2010). Um die Lokalisierung von Bax in den Mitochondrien zu untersuchen, wurden mitochondriale Fraktionen von Lebergewebe uninfizierter und infizierter Mäuse gewonnen und analysiert. Nicht nur auf Gesamtzellebene (**Abbildung 12 A**), sondern auch in den mitochondrialen Fraktionen (**Abbildung 12 C**) konnte eine Anreicherung von Bax beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass es durch virale Infektion unter den Proteinen der Bcl-2-Familie zu einem Ungleichgewicht zugunsten von proapoptotischen Faktoren kommt, die eine Mitochondrienpermeabilisierung begünstigen können.



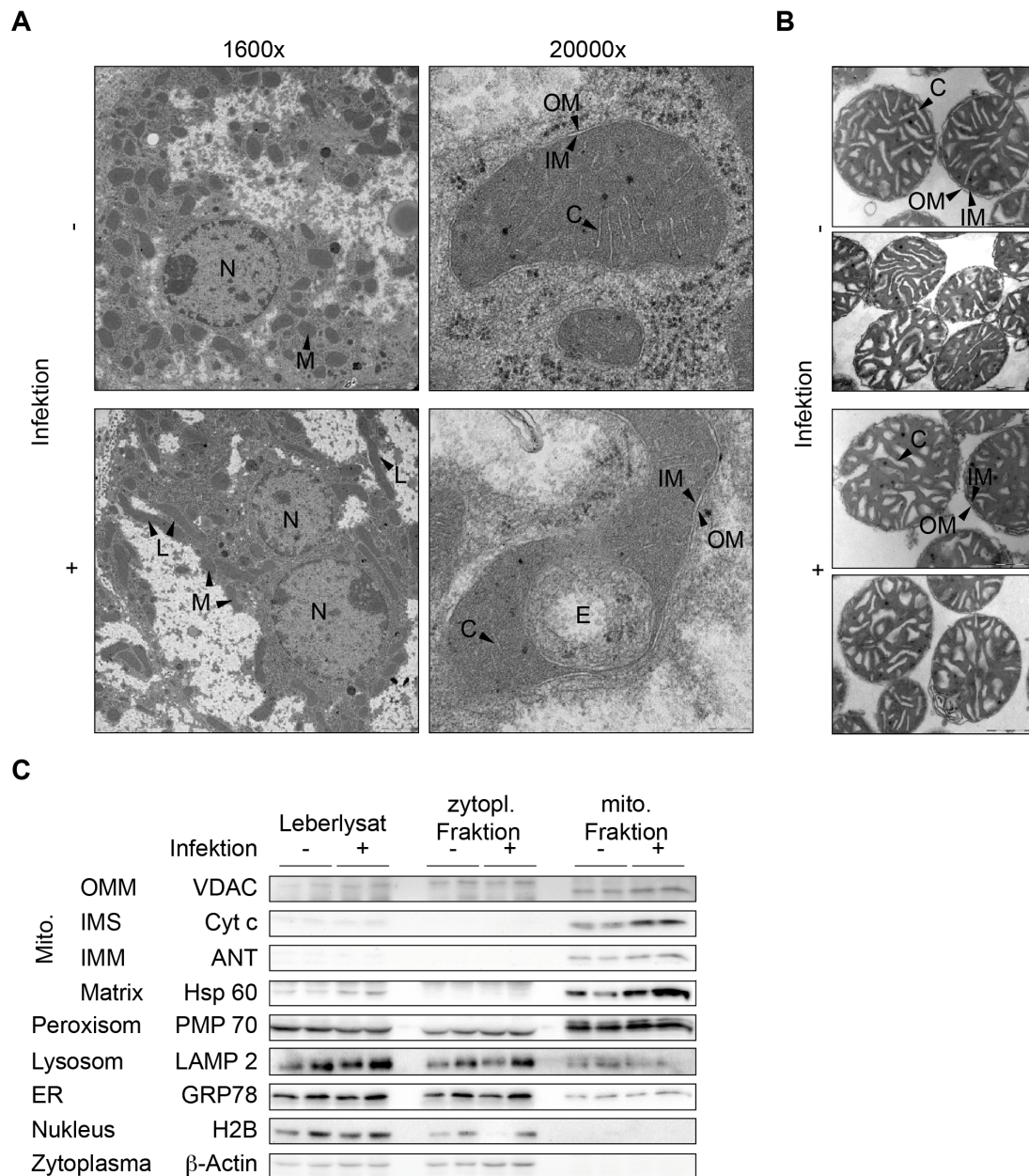
**Abbildung 12: Beeinflussung von Proteinen der Bcl-2-Familie durch virale Infektion.**

**(A-C)** Untersuchung an Lebern uninfizierter und infizierter ( $1 \times 10^9$  PFU AdGOL, 48 h p.i.) Mäuse. **(A)** Immunoblot mit Leberlysaten gegen die gekennzeichneten Proteine der Bcl-2-Familie. β-Actin diente als Ladekontrolle. **(B)** qRT PCR von Lebergewebe zur Bestimmung der mRNA Level von bax relativ zu gapdh. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus, dargestellt mit Mittelwert  $\pm$  SEM. **(C)** Immunoblot mit mitochondrialen Fraktionen von Lebergewebe gegen Bax und gegen VDAC als mitochondriale Ladekontrolle (n=1 Maus). Einer von fünf unabhängigen Versuchen wird gezeigt.

## 5. Die virale Infektion wirkt sich auf apoptotische Funktionen von Mitochondrien aus.

### 5.1. Die virale Infektion beeinflusst die Morphologie von Mitochondrien.

Die Mitochondrien dienen durch die Integration der verschiedenen zellulären Stress-Signale also als Checkpoint für die Entscheidung über das Schicksal der Zelle (Kroemer et al., 2007). Außerdem können sie auch selbst eine Quelle von Stressoren wie ROS sein (Hill et al., 2012). Deshalb sollten im weiteren Verlauf der Arbeit die Mitochondrien uninfizierter und infizierter Lebern genauer untersucht werden.



**Abbildung 13: Auswirkungen der viralen Infektion von Hepatozyten auf die mitochondriale Morphologie.**

**(A-B)** Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen von Lebergewebe (n=2 Mäuse, einmaliges Experiment) **(A)** und isolierten Leber-Mitochondrien (n=3 Mäuse aus 3 unabhängigen Experimenten) **(B)** uninfizierter (oben) und infizierter ( $1 \times 10^9$  PFU AdGOL, 48 h p.i.) Mäuse (unten). N: Nukleus; M: Mitochondrium; OMM/IMM: äußere/innere Mitochondrienmembran; C: Cristae; L: elongiertes Mitochondrium; E: Einschlusskörper. Repräsentative Bildausschnitte sind gezeigt. Die Elektronenmikroskopie des Lebergewebes und der isolierten Mitochondrien wurde in Kooperation mit Dr. Michaela Aichler (Institut für Pathologie, Helmholtz Zentrum München) bzw. Sabine Schmitt (Arbeitsgruppe von PD Dr. Zischka, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. **(C)** Immunoblot gegen mitochondriale Proteine und Proteine der gekennzeichneten zellulären Kompartimente. Eingesetzt wurden je 20 µg Protein von komplettem Leberlysate, zytoplasmatischer (zytopl.) Fraktion und mitochondrialer (mito.) Fraktion, die während der Mitochondrienisolation separiert wurden. Die Leberentnahme erfolgte an Mäusen behandelt wie in (A-B).

#### IV. Ergebnisse

In den elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen von Lebergewebe ist zu sehen, dass Hepatozyten eine Vielzahl von Mitochondrien enthalten (**Abbildung 13 A**). Außerdem ist das Doppelmembransystem der Mitochondrien zu erkennen, mit äußerer Mitochondrienmembran (OMM), zu Cristae aufgefalteter innerer Mitochondrienmembran (IMM) und dazwischenliegendem Inter-membranraum (IMS).

Die Mitochondrien im uninfizierten Lebergewebe (**Abbildung 13 A, obere Reihe**) haben eine runde bis ovale Form. Im Gegensatz dazu lassen sich im infizierten Gewebe neben ovalen auch elongierte, tubuläre Mitochondrien erkennen (**Abbildung 13 A, untere Reihe**). Zusätzlich sind vereinzelt Mitochondrien mit Einschlusskörpern auszumachen. Abgesehen davon kann aber keine drastische morphologische Veränderung der Mitochondrien durch die Infektion beobachtet werden.

Um die Auswirkungen der Infektion auf die Funktion der Mitochondrien genauer zu analysieren, wurden Mitochondrien durch Homogenisation von Gewebe und anschließender differentieller Zentrifugation mit Dichtegradient aus der Leber isoliert. Anhand von EM-Aufnahmen zeigte sich kein morphologischer Unterschied zwischen isolierten Mitochondrien uninfizierter und infizierter Lebern (**Abbildung 13 B**).

Außerdem lässt sich in den EM-Aufnahmen eine hohe Reinheit des Mitochondrien-Isolats erahnen. Dies wurde durch einen Immunoblot bestätigt: Es ist eine starke relative Anreicherung von mitochondrialen Proteinen gegenüber Proteinen anderer Zellkompartimente im Isolat zu erkennen (**Abbildung 13 C**). So finden sich zytoplasmatische, nukleäre, lysosomale und ER-Proteine in der mitochondrialen Fraktion kaum wieder. Das peroxisomale Protein PMP70 wurde in der mitochondrialen Fraktion zwar angereichert, aber in deutlich geringerem Maße als die mitochondrialen Proteine.

In der zytoplasmatischen Fraktion fehlen Proteine der mitochondrialen Subkompartimente. Dies spricht für eine geringe Zerstörung von Mitochondrien während des Isolationsprozesses, was einen Austritt mitochondrialer Proteine ins Zytoplasma zur Folge hätte.

Somit kann also davon ausgegangen werden, dass die Mitochondrienisolation eine sehr reine Fraktion intakter Mitochondrien ergibt.

Anhand der isolierten Mitochondrien sollten im Folgenden sowohl ihre bioenergetischen als auch ihre proapoptotischen Funktionen untersucht werden.

## 5.2. Mitochondrien infizierter Lebern zeigen veränderte respiratorische Parameter.

Die bekannteste Funktion von Mitochondrien ist die der Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP unter Verbrauch von Sauerstoff an der Atmungskette. Die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR<sup>68</sup>) isolierter Mitochondrien kann also als Maß für die mitochondriale bioenergetische Funktion dienen. Bei der respirometrischen Analyse ermöglicht die Applikation von spezifischen Inhibitoren verschiedener Prozesse in der Atmungskette die Bestimmung von Schlüsselparametern mitochondrialer bioenergetischer Funktion (Rogers et al., 2011). Zuerst wurde die basale Atmung, der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien in Anwesenheit eines Substrats gemessen. Als Substrat wurden Succinat oder eine Kombination von Pyruvat und Malat eingesetzt. Succinat wird an Komplex II<sup>69</sup> oxidiert und schleust dort Elektronen in die Atmungskette ein. Pyruvat/Malat führen zu einer vorrangigen Beteiligung von Komplex I gegenüber Komplex II an der Atmungskette, wodurch ein anderes Transportverhältnis von Elektronen zu Protonen zustande kommt. Außerdem unterscheiden sich die Substrate an ihrem Bedarf an Transportern und ihrer Beteiligung an Zitratzyklusprozessen (Brand and Nicholls, 2011; Gnaiger, 2014). Die basale Atmung (Substrat) in Anwesenheit des jeweiligen Substrats zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Mitochondrien infizierter und uninfizierter Lebern (**Abbildung 14 A+D**).

Da der Elektronentransport und der Protonentransport miteinander einhergehen, ist der Sauerstoffverbrauch auch immer vom Protonengradienten abhängig. Mit ansteigendem Protonengradient wird der Transport weiterer Protonen und somit die Atmung gehemmt. Durch die Zugabe von ADP, welches eine Produktion von ATP unter Verbrauch des Protonengradienten erlaubt, wurde der Sauer-

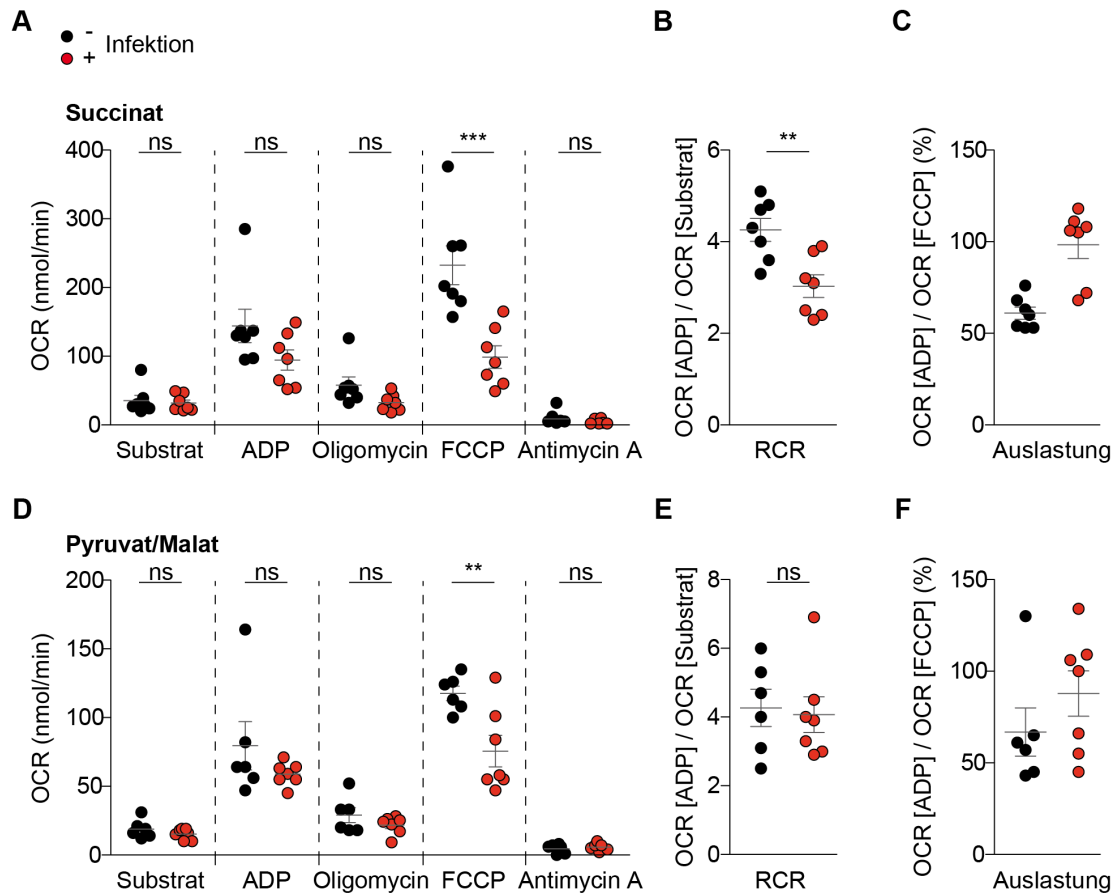
<sup>68</sup> engl.: oxygen consumption rate

<sup>69</sup> Komplex der Atmungskette; nicht zu verwechseln mit den TNFR-Komplexen



## IV. Ergebnisse

stoffverbrauch entsprechend gesteigert. Obwohl sich eine Tendenz zu geringerer ADP-stimulierter Atmung nach Infektion abzeichnete, war auch hier kein signifikanter Unterschied festzustellen.



**Abbildung 14: Respirometrische Analyse isolierter Mitochondrien.**

**(A-F)** Analyse bioenergetischer Parameter anhand der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) von isolierten Mitochondrien unter Konsum der Substrate Succinat **(A-C)** oder Pyruvat und Malat **(D-F)**. Die OCR wurde auf die mitochondriale Citratsynthase-Aktivität normalisiert. **(A+D)** OCR vor (Substrat) und nach sequentieller Zugabe der gekennzeichneten Reagenzien, die in die Atmungskette eingreifen (Oligomycin hemmt die ATP-Synthase; FCCP ist ein Protonophor; Antimycin A hemmt Komplex III). Respiratorischer Kontroll-Quotient (RCR) **(B+E)** und respiratorische Auslastung **(C+F)** wurden aus den Daten von (A) bzw. (D) berechnet. Daten von drei unabhängigen Experimenten mit je 2-3 Tieren werden gezeigt. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Maus; dargestellt mit Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte durch einen zweiseitigen Student's t-Test (\*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; ns= nicht signifikant  $p > 0,05$ ). Die respirometrische Analyse wurde in Kooperation mit Dr. Kerstin Haas (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Klingenspor, Molekulare Ernährungsmedizin, Technische Universität München) mit einem Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer durchgeführt.



Das Verhältnis zwischen basaler Atmung (Substrat) und ADP-stimulierter Atmung wird als respiratorischer Kontroll-Quotient (RCR<sup>70</sup>) bezeichnet und ist ein Maß für den Wirkungsgrad der mitochondrialen Atmung (Chance and Williams, 1955). Der RCR war im Falle von Succinat als Substrat in Proben infizierter Lebern signifikant niedriger als in Proben nicht infizierter Lebern **(Abbildung 14 B)**. Im Falle von Pyruvat/Malat als Substrat war der RCR aber gleich **(Abbildung 14 E)**.

Im nächsten Schritt wurde die ATP-Synthase durch Oligomycin inhibiert, sodass der Sauerstoffverbrauch nun ausschließlich über einen Leckstrom von Protonen zurück in die Matrix gesteuert wurde **(Abbildung 14 A+D)**. Hier konnte keine signifikante Auswirkung der Infektion auf die Leck-Atmung detektiert werden.

Anschließend wurde durch Applikation des Protonophors FCCP die Atmung von der ATP-Synthase entkoppelt. Dadurch war die Atmung also nicht länger durch einen hohen elektrochemischen Protonengradienten limitiert, sondern nur von der Kapazität der Atmungskette abhängig. Die FCCP-entkoppelte Atmung war für beide Substrate in den Mitochondrien infizierter Mäuse deutlich geringer als die der Mitochondrien unbehandelter Mäuse. Dies weist darauf hin, dass die Leber-Mitochondrien infizierter Mäuse ein geringeres Potential hatten, ihre Atmung zu steigern, und so eine geringere Kapazität der Atmungskette besaßen.

Schließlich zeigte auch die Betrachtung des Quotienten von ADP-stimulierter Atmung zu FCCP-entkoppelter Atmung eine höhere respiratorische Auslastung von Mitochondrien infizierter Mäuse **(Abbildung 14 C+F)**.

In einem letzten Schritt der respirometrischen Analyse wurde der Elektronentransport durch einen Inhibitor von Komplex III, Antimycin A, geblockt **(Abbildung 14 A+D)**. Erwartungsgemäß wurde dadurch der Sauerstoffverbrauch nahezu komplett inhibiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mitochondriale Atmung durch eine virale Infektion negativ beeinflusst wurde. Sowohl die RCR in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat, als auch die FCCP-abhängige Atmung waren nach Infektion stark erniedrigt, was auf eine mitochondriale Dysfunktion hinweist.

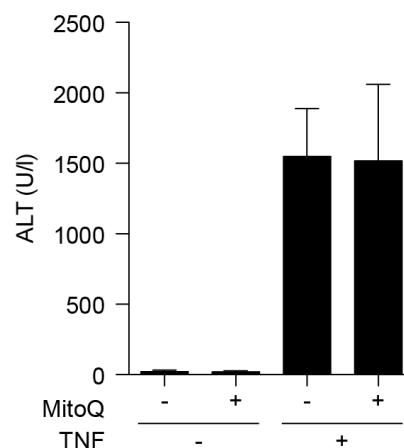
---

<sup>70</sup> engl.: respiratory control ratio

### 5.3. Mitochondriale ROS haben keinen Einfluss auf die TNF-vermittelte virale Hepatitis.

Eine potentielle Ursache für die Beeinträchtigung der bioenergetischen Funktionen der Mitochondrien kann der in **Abbildung 11 D** offenbarte vermehrte oxidative Stress nach Infektion sein. Mitochondrien stellen nicht nur eine maßgebliche Quelle reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) dar, sondern sind auch ein Ziel ihrer schädigenden Wirkung. So kann oxidativer Stress Auswirkungen auf die bioenergetischen Funktionen der Mitochondrien haben (Dranka et al., 2011; Hill et al., 2012).

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden Mäuse mit einem Mitochondrien-spezifischen Antioxidans, dem Ubiquinon MitoQ, behandelt, das mitochondrial entstehende ROS neutralisiert (Smith and Murphy, 2010).



**Abbildung 15: Untersuchung der Rolle mitochondrialer ROS in der TNF-vermittelten viralen Hepatitis durch das Antioxidans MitoQ.**

ALT-Aktivitätsmessung von Mäusen, die eine 6-tägige Behandlung mit MitoQ (+) oder der Kontrollsubstanz Decyl-TPP (-) erfahren haben. Blutentnahme erfolgte zwei Tage nach Infektion ( $1 \times 10^9$  PFU AdGOL) der gekennzeichneten Gruppen und 4 h nach TNF-Injektion aller Gruppen (n=4 Mäuse, einmaliges Experiment).

Die Leberschädigung von MitoQ-behandelten Mäusen nach Infektion und TNF-Injektion wurde im Vergleich zu Mäusen, denen eine Kontrollsubstanz verabreicht wurde, gemessen. Dabei konnte kein Effekt der Behandlung mit MitoQ auf die Entwicklung einer Hepatitis festgestellt werden (**Abbildung 15**). Dies lässt vermuten, dass mitochondriale ROS in der TNF-vermittelten viralen Hepatitis keine wesentliche Rolle spielen.

#### 5.4. Die Mitochondrien infizierter Lebern zeigen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Bid und Calcium.

In den folgenden Versuchen sollten schließlich die apoptotischen Funktionen der Mitochondrien genauer betrachtet werden, da diese für die Ausführung von Apoptose in Typ II-Zellen wie Hepatozyten essentiell sind und so vermutlich auch in der TNF-vermittelten Hepatitis eine zentrale Rolle spielen (Yin et al., 1999). Das zuvor demonstrierte Ungleichgewicht der Bcl-2-Proteine und auch weitere Effekte von DDR und oxidativem Stress (**Abbildung 12, Abbildung 11**), die durch Infektion herbeigeführt werden, könnten eine Permeabilisierung der Mitochondrien begünstigen.

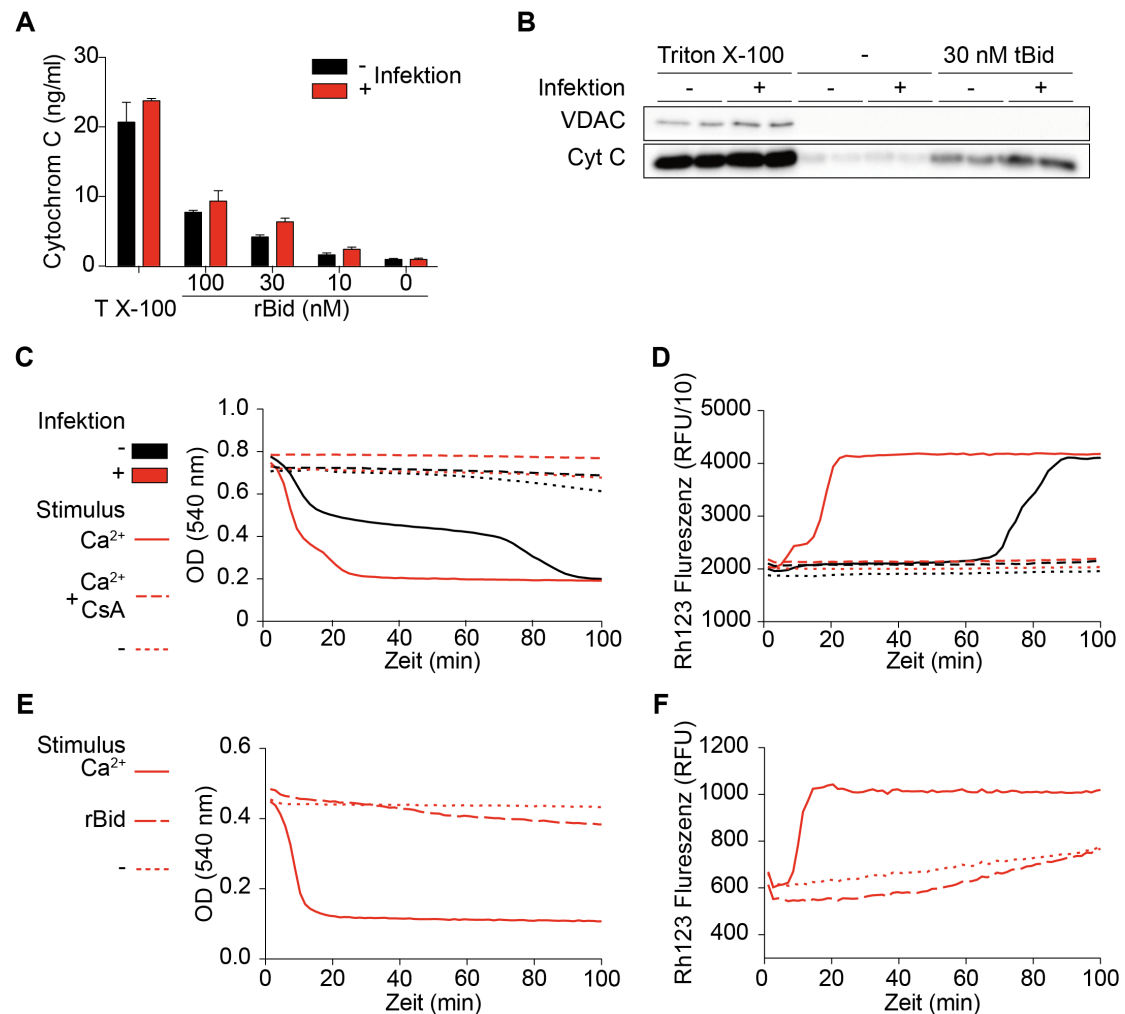
Hier stellt sich also die Frage, wie die Mitochondrien infizierter Mäuse auf einen apoptotischen Trigger, wie die durch TNFR1 eingeleitete apoptotische Kaskade, reagieren würden. Es konnte gezeigt werden (**Abbildung 4 A**), dass Bid im Rahmen der proapoptotischen TNFR1-Signaltransduktion nach Infektion und TNF-Behandlung gespalten wird. Um die proapoptotische TNFR1-Signaltransduktion zu simulieren, wurde deshalb im folgenden Experiment rekombinantes, durch Caspase-8 gespaltenes Bid (rBid) verwendet. Dieses wurde in aufsteigender Konzentration zur Stimulation isolierter Lebermitochondrien unbehandelter oder infizierter Mäuse eingesetzt.

Mittels ELISA und Immunoblot des Überstands der Mitochondrien konnte eine Ausschüttung von Cytochrom C (Cyt C) in Abhängigkeit der rBid-Konzentration gemessen werden (**Abbildung 16 A-B**). Die maximale Cyt C-Ausschüttung wurde durch Permeabilisierung der Mitochondrien mit Triton-X 100 erzielt. Mit der höchsten eingesetzten Konzentration an rBid konnte eine Ausschüttung von etwa 35-45% des Maximalwerts erreicht werden. Dabei war die Ausschüttung von Cyt C durch Mitochondrien infizierter Mäuse bei allen eingesetzten rBid-Konzentrationen stets leicht erhöht.

Die spontane Ausschüttung von Cyt C ohne Stimulation war gering und lag bei unter 5% des Maximalwerts. Interessant ist, dass trotz des Ungleichgewichts der Bcl-2-Proteine ohne weiteren Stimulus keine gesteigerte Ausschüttung von Cyt C von den Mitochondrien infizierter Mäuse erfolgte.

Mitochondrien infizierter Mäuse reagieren demnach spezifisch auf rBid mit erhöhter Cyt C-Ausschüttung.

## IV. Ergebnisse



**Abbildung 16: Einfluss viraler Infektion auf die apoptotischen Funktionen der Mitochondrien.**

**(A+B)** Cytochrom C-Ausschüttung nach Stimulation isolierter Mitochondrien mit rekombinantem, Caspase 8-gespaltenem Bid (rBid). Inkubation isolierter Lebermitochondrien infizierter ( $1 \times 10^9$  PFU AdGOL, 48 h p.i.) und uninfizierter Mäuse für 30 min mit den gekennzeichneten Konzentrationen von rBid bzw. zur kompletten Permeabilisierung der Mitochondrien mit Triton X-100 (T X-100). Anschließende Analyse des Mitochondrien-freien Überstands durch ELISA **(A)** und Immunoblot **(B)** gegen Cytochrom C ( $n=2$  Mäuse). Ein repräsentatives von drei Experimenten ist gezeigt. Darstellung von Mittelwert + SD in **(A)**. VDAC (lokalisiert in der OMM) diente als Kontrolle in **(B)**. **(C+E)** Messung von optischer Dichte (OD) bei 540 nm als Maß für das Anschwellen der Mitochondrien in einer Suspension. **(D+F)** Messung der Membranpotential-abhängigen Fluoreszenz von Rhodamin 123 (Rh123). **(C+D)** Die Stimulation zum Zeitpunkt 0 erfolgte mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  mit und ohne zusätzliche Applikation von Cyclosporin A (CsA), einem Inhibitor der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition (mPT). **(D+F)** Die Stimulation zum Zeitpunkt 0 erfolgte mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , oder  $100 \text{ nM}$  rBid. In **(C-F)** ist je ein repräsentatives von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit  $n=1$  Maus pro Gruppe gezeigt. Dargestellt ist der Mittelwert von je drei technischen Replikaten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine virale Infektion die Mitochondrien der Leber für rBid-induzierte Cytochrom C-Ausschüttung sensibilisiert.

Gespaltenes Bid ist bekannt dafür, eine Permeabilisierung der OMM (MOMP<sup>71</sup>) durch die Aktivierung von Bcl-2-Effektorproteinen wie Bax und Bak herbeizuführen. Deren Aktivierung führt zur Oligomerisierung und Formation von MAC-Kanälen in der OMM (Pavlov et al., 2001; Wei et al., 2001).

MOMP kann jedoch auch durch einen anderen Mechanismus, die mitochondriale Permeabilitäts-Transition (mPT) hervorgerufen werden. Der bekannteste Induktor der mPT sind hohe Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Konzentrationen (Hunter and Haworth, 1979).

Deshalb wurde in einem weiteren Versuch die Sensitivität der Mitochondrien gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  untersucht. Bei der Öffnung der mPT-Pore (mPTP) kommt es zum Verlust des Membranpotentials an der IMM und durch den Einstrom von Wasser zum Anschwellen bis hin zur Ruptur der Mitochondrien (Bonora and Pinton, 2014). Die Schwellung (erkennbar an einer Reduktion der optischen Dichte) und der Membranpotentialverlust (charakterisiert durch einen Anstieg der Rhodamin 123-Fluoreszenz) von isolierten Mitochondrien infizierter und uninfizierter Mäuse wurde nach Stimulation mit  $\text{Ca}^{2+}$  über einen Zeitraum von 100 min verfolgt (**Abbildung 16 C+D**). Das Anschwellen sowie der Membranpotentialverlust setzten in den Mitochondrien infizierter Lebern deutlich früher ein und zeigten einen schnelleren Verlauf als in den Mitochondrien uninfizierter Lebern. Durch zusätzliche Applikation von Cyclosporin A (CsA), einem Inhibitor der mPTP, konnte das  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Anschwellen sowie der Membranpotentialverlust inhibiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die virale Infektion die Mitochondrien gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierter mPT sensibilisiert.

Werden die isolierten Mitochondrien hingegen mit rBid stimuliert, ist kein Anschwellen oder Membranpotentialverlust zu beobachten (**Abbildung 16 E+F**). Die durch gespaltenes Bid verursachte Permeabilitätssteigerung

---

<sup>71</sup> engl.: mitochondrial outer membrane permeabilisation

## IV. Ergebnisse

isolierter Mitochondrien scheint also mPT-unabhängig und somit ausschließlich über eine Permeabilisierung der OMM vermittelt zu sein.

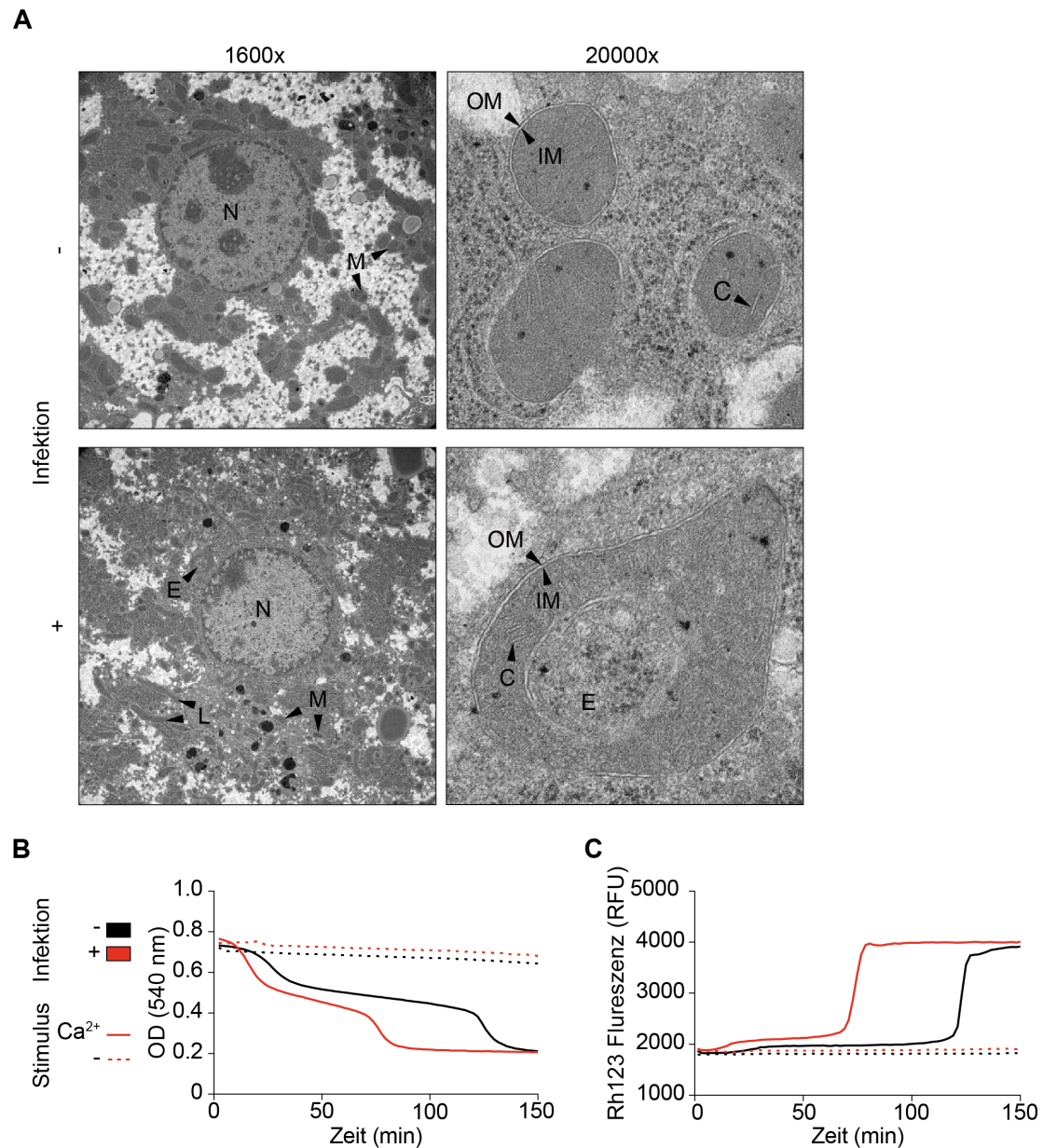
Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die virale Infektion eine Sensibilisierung der Leber-Mitochondrien sowohl für MAC- als auch mPTP-vermittelte MOMP bewirkt.

### **5.5. Die mitochondrialen Veränderungen durch Infektion sind nicht abhängig von Steady State-TNFR-Signalen.**

Im vorherigen Abschnitt wurde beschrieben, dass eine virale Infektion der Leber Auswirkungen auf die mitochondriale Morphologie und Funktionen hat. Nun sollte ausgeschlossen werden, dass ein synergistischer Effekt der Infektion und physiologisch in der Maus vorkommendem TNF in kleinem Maße die apoptotischen Prozesse in Gang setzt, die in Abschnitt IV.2.1 nach Applikation von exogenem TNF beschrieben sind. Diese wären zwar offensichtlich nicht ausreichend, um die Vollstreckung der Apoptose zu bewirken, aber könnten möglicherweise eine Beeinflussung der Mitochondrien verursachen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden Mitochondrien uninfizierter und infizierter TNFR1/2 Doppel-KO (DKO)-Mäuse in Hinblick auf ihre Morphologie und ihre Reaktion auf  $\text{Ca}^{2+}$  untersucht.

Auch in den infizierten TNFR1/2 DKO-Mäusen konnten vermehrt elongierte Mitochondrien und auch Einschlüsse in Mitochondrien entdeckt werden (**Abbildung 17 A**). Ebenso konnte wie bei WT-Mäusen (**Abbildung 16 C+D**) auch bei den infizierten TNFR KO-Mäusen eine erhöhte Sensitivität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierter mPT festgestellt werden (**Abbildung 17 B+C**).

Insgesamt zeigten die TNFR KO-Mäuse mit den WT-Kontrollen vergleichbare Veränderungen. Dies spricht dafür, dass die mitochondrialen Veränderungen nach Infektion unabhängig von Steady State-TNFR-Signalen sind.



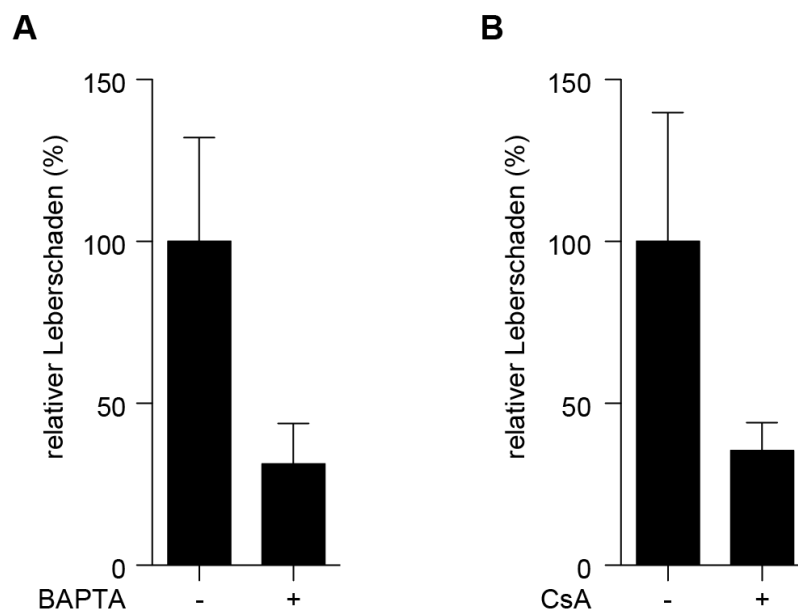
**Abbildung 17: Die Rolle von Steady State-TNFR-Signalen für die mitochondrialen Veränderungen durch Infektion.**

(A) EM-Aufnahmen von Lebergewebe uninfizierter (oben) und infizierter (unten) TNFR1/2 Doppel-KO (DKO)-Mäuse (n=2 Mäuse, einmaliges Experiment). Die Leberentnahme erfolgte 48 h nach Infektion mit  $1 \times 10^9$  PFU AdGOL. N: Nukleus; M: Mitochondrium; OMM/IMM: äußere/innere Mitochondrienmembran; C: Cristae; L: elongiertes Mitochondrium; E: Einschlusskörper. Gezeigt sind repräsentative Bildausschnitte. Die Elektronenmikroskopie wurde von Dr. Michaela Aichler (Institut für Pathologie, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. (B) Mitochondriales Anschwellen und (C) Membranpotentialverlust gemessen an der Veränderung von  $\text{OD}_{(540 \text{ nm})}$  bzw. Rh123-Fluoreszenz nach Stimulation von isolierten Lebermitochondrien von TNFR1/2 DKO-Mäusen mit 100 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . (B+C) Die Behandlung der Mäuse erfolgte wie in (A). Je ein repräsentatives von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit n=1 Maus pro Gruppe ist gezeigt. Dargestellt ist der Mittelwert von je drei technischen Replikaten.

## 6. Ein pharmakologischer Eingriff in Calcium-Signale oder die mitochondriale Permeabilitäts-Transition kann die TNF-vermittelte virale Hepatitis reduzieren.

Zuvor konnte anhand eines *in-vitro*-Versuchs gezeigt werden, dass die virale Infektion Mitochondrien für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Induktion der mPT sensibilisiert (**Abbildung 16 C+D**). Abschließend sollte *in vivo* untersucht werden, welche Rolle  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale und die mPT in der TNF-vermittelten viralen Hepatitis haben. Zur Inhibition von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen wurde der Zell-permeable  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA AM verwendet. Die ALT-Aktivität im Blut von infizierten, TNF-injizierten Mäusen stieg unter Behandlung mit BAPTA nur mäßig an (**Abbildung 18 A**). So betrug 2 h nach TNF-Injektion die Leberschädigung in BAPTA-behandelten Mäusen nur 31% der Schädigung in Mäusen, die eine Lösungsmittelkontrolle erhielten.

Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die TNF-vermittelte Leberschädigung infizierter Mäuse  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist.



**Abbildung 18: Intervention mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen und mPT hat Auswirkungen auf die Leberschädigung.**

**(A+B)** ALT-Messung TNF-behandelter (2 h), infizierter ( $5 \times 10^8$  PFU AdGOL, 48 h p.i.) Mäuse **(A)** nach Injektion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators BAPTA AM (+) oder des Lösungsmittels DMSO (-) 15 min vor TNF (n=5 Mäuse) oder **(B)** nach Injektion von CsA (+) oder DMSO (-) 30 min vor TNF (n=4 Mäuse). Gezeigt ist die Leberschädigung als prozentualer Anteil an der ALT-Aktivität nach Applikation der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle. Darstellung von Mittelwert + SD.



Wie auch zuvor *in vitro* (**Abbildung 16**) wurde als direkter Inhibitor der mPTP CsA eingesetzt. Die TNF-induzierte virale Hepatitis konnte durch CsA-Injektion signifikant um 65% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle verringert werden (**Abbildung 18 B**). Somit konnte gezeigt werden, dass die mPTP ein wichtiger Bestandteil der Maschinerie der TNF-vermittelten viralen Hepatitis ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die TNF-abhängige virale Hepatitis in ähnlichem Ausmaß durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale und mPT vermittelt wird.

## V. Diskussion

Virale Infektionen der Leber gehen mit Inflammation (Hepatitis) einher und können bei chronischen Verläufen durch den permanenten Zelluntergang von Hepatozyten schwere Sekundärerkrankungen wie Leberzirrhose und Leberkrebs nach sich ziehen (Guidotti and Chisari, 2006). Ein ausschlaggebender Faktor sowohl bei der Bekämpfung viraler Infektionen der Leber als auch für die Schwere des Krankheitsverlaufs ist der Zelltod von Hepatozyten (Herzer et al., 2007).

Zytotoxische T-Lymphozyten haben eine zentrale Rolle in der Induktion von Zelltod infizierter Hepatozyten (Knolle and Thimme, 2014; Rehermann, 2013). Sie agieren dabei durch die Induktion von Apoptose über FasL/Fas-Interaktion und die Ausschüttung von Perforin und Granzymen (Chavez-Galan et al., 2009; Lowin et al., 1994b). Diese Effektorfunktionen sind von einer direkten Erkennung viraler Antigen/MHC I-Komplexe auf den Hepatozyten durch den TCR abhängig. Dadurch wird eine Selektivität für infizierte Hepatozyten gewährleistet (Bossi et al., 2002).

Darüber hinaus wurde kürzlich eine neue, nicht-kanonische CTL-Effektorfunktion identifiziert, die durch eine Ausschüttung von TNF und der Induktion von TNFR-abhängiger Apoptose ausgeübt wird. Dieser Mechanismus ist unabhängig von direktem Kontakt und Antigenpräsentation der infizierten Hepatozyten. Überraschenderweise wird dabei trotzdem eine Selektivität für infizierte Hepatozyten erreicht (Wohlleber et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Grundlage für diese selektive TNF-vermittelte Tötung virusinfizierter Hepatozyten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine virale Infektion zu einer drastischen Veränderung der TNF-vermittelten Signaltransduktion im Hepatozyten führt.

## 1. Die virale Infektion sensibilisiert Hepatozyten für TNFR1-vermittelte Apoptose trotz gleichzeitig erhaltener anti-apoptotischer NFκB-Signaltransduktion.

Die TNF-vermittelte virale Hepatitis wird über eine direkte Wirkung von TNF auf die Hepatozyten vermittelt (Wohlleber et al., 2012). TNF kann an zwei verschiedene Rezeptoren binden, TNFR1 und TNFR2 (Hohmann et al., 1989), die TNF-vermittelte virale Hepatitis ist jedoch allein von TNFR1 abhängig (**Abbildung 3**).

Über TNFR1 können durch die sequentielle Bildung unterschiedlicher Multiproteinkomplexe verschiedene, sowohl pro- als auch antiapoptotische Signalwege induziert werden. Nach TNFR1-Stimulation kommt es zur Bildung von Komplex I, in dem der antiapoptotische NFκB-Signalweg eingeleitet wird. Die darauffolgende Internalisierung des Rezeptors ermöglicht die Induktion von Zelltod über die Bildung von Komplex II (Micheau and Tschopp, 2003).

In den meisten Zelltypen führt TNFR1-Stimulation allerdings ohne Weiteres nicht zur Induktion von Zelltod (Natoli et al., 1998; Nophar et al., 1988). Die proapoptotische Signalkaskade, einschließlich der Aktivierung von Caspase 8, Bid, Caspase 9, Caspase 3 und PARP wurde tatsächlich in uninfizierten Mäusen nicht eingeleitet, sondern ausschließlich nach Infektion (**Abbildung 4**). Dies bedeutet, dass in uninfizierten Zellen TNFR1-vermittelte Apoptose-Signale schon sehr weit proximal blockiert sein müssen, wohingegen diese Blockade durch Infektion überwunden wird.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, worin diese Blockade bestehen könnte und wie sie durch die virale Infektion überwunden werden könnte.

Es wird davon ausgegangen, dass es zwei Wege gibt, auf denen Caspase 8 über TNFR1 aktiviert werden kann, und zwar in TNFR-Komplex IIa und IIb. Dementsprechend werden zwei verschiedene Checkpoints im proximalen TNFR-Apoptose-Signalweg postuliert, welche die Induktion von Zelltod regulieren: Einen NFκB-vermittelten Checkpoint für TNFR-Komplex IIa, der in Abhängigkeit von Protein-Neusynthese für langfristige, protektive Effekte sorgt und einen frühen Checkpoint für TNFR-Komplex IIb, der unabhängig von NFκB und Proteinexpression greift, sondern zentral vom Ubiquitinnetzwerk am TNFR-

Komplex I abhängig ist (Dondelinger et al., 2013; Haas et al., 2009; Natoli et al., 1998; O'Donnell and Ting, 2010).

Die protektiven Effekte von NFκB werden durch die Transkription und Synthese von antiapoptotischen Proteinen erzielt. Dabei ist das NFκB-Zielgen cFLIP für die Inhibition der Caspase 8-Aktivierung in Komplex IIa von zentraler Bedeutung (Irmeler et al., 1997; Micheau et al., 2001; Micheau and Tschopp, 2003; Wang et al., 2008). In Abwesenheit von NFκB-Signaltransduktion z.B. durch experimentelle Inhibition der NFκB-Aktivierung oder Proteinsynthese wird die TNFR1-abhängige Aktivierung von Caspase 8 begünstigt (Kreuz et al., 2001; Leist et al., 1994; O'Donnell and Ting, 2011; Van Antwerp et al., 1996).

Erwartungsgemäß erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach TNF-Stimulation in uninfizierten Mäusen eine Aktivierung von NFκB, überraschenderweise aber ebenso in infizierten Tieren (**Abbildung 5**).

Es erscheint paradox, dass in infizierten Mäusen trotz der eingeleiteten antiapoptotischen NFκB-Signale Apoptose veranlasst wird. Die Aktivierung der beiden scheinbar widersprüchlichen Signalwege erfolgte jedoch tatsächlich in ein und dem selben infizierten Hepatozyten (**Abbildung 7**). Die Induktion des antiapoptotischen NFκB-Signalwegs ging dabei sogar der Caspasen-Aktivierung voraus (**Abbildung 6**). Zu beachten bleibt jedoch, dass die Apoptose-Signale über eine Enzymkaskade übermittelt werden, während die protektiven Effekte von NFκB abhängig von der Proteinexpression antiapoptotischer Proteine sind. Somit kommt die zwar schnell induzierte NFκB-Antwort erst mit einer Verzögerung zum Tragen (Natoli et al., 1998). Dieser Effekt betrifft allerdings die uninfizierten und infizierten Tiere gleichermaßen, da die NFκB-Aktivierung bei beiden Gruppen mit der gleichen Kinetik erfolgte.

Es war auch kein direkter Einfluss der Infektion auf die Menge von cFLIP zu beobachten (**Abbildung 8 C**), der zum Beispiel durch eine reduzierte basale, TNF-unabhängige NFκB-Aktivierung hätte bedingt sein können (Rahmani et al., 2001).

Folglich muss der TNFR1-vermittelten Induktion von Apoptose nach Infektion ein NFκB-unabhängiger Mechanismus zu Grunde liegen.

## 2. Die virale Infektion begünstigt die Aktivierung der Initiator-Caspase 8 wahrscheinlich in TNFR1-Komplex IIb.

Alternativ zu Komplex IIa, der sich unter NF $\kappa$ B-Inhibition formiert, kann Caspase 8 nach TNFR1-Stimulation in TNFR-Komplex IIb aktiviert werden. Die Formation von Komplex IIb wird über das Ubiquitinnetzwerk am TNFR-Komplex I reguliert (Christofferson et al., 2014; Dondelinger et al., 2013; Haas et al., 2009; Legarda-Addison et al., 2009). Die virale Infektion könnte die Aktivierung von Caspase 8 dementsprechend durch eine Beeinflussung der Ubiquitylierungen an Komplex I ermöglichen.

Durch die experimentelle Inhibition oder Deletion der Ubiquitinligasen cIAP1 und cIAP2 oder des Adapterproteins TRAF2 lässt sich in das Ubiquitinnetzwerk eingreifen und die TNF-vermittelte Einleitung von Apoptose über den Komplex IIb fördern (Petersen et al., 2007; Tada et al., 2001; Varfolomeev et al., 2007; Vince et al., 2009; Wang et al., 2008). Interessanterweise wird wie bei der TNF-vermittelten viralen Hepatitis auch in diesen Studien eine Induktion von Apoptose beobachtet, ohne dass die NF $\kappa$ B-Aktivierung beeinträchtigt wird (Varfolomeev et al., 2007; Wang et al., 2008).

Physiologisch kann die Verfügbarkeit von TRAF2 und cIAP1/2 durch TNFR2-Stimulation reduziert werden (Chan and Lenardo, 2000; Fotin-Mleczek et al., 2002; Li et al., 2002). Obwohl TNFR2 kein Todesrezeptor ist (Wajant et al., 2003), ist auf diese Weise seine Beteiligung an der proapoptotischen TNF-Signaltransduktion im infizierten Hepatozyten durchaus denkbar. Dies konnte jedoch mit Hilfe von TNFR2 KO-Mäusen ausgeschlossen werden (**Abbildung 3**).

cIAP1 und 2 können außerdem über die mitochondrialen Faktoren SMAC und HtrA2 inaktiviert werden (Verhagen et al., 2000; Verhagen et al., 2002; Yang et al., 2003). Dementsprechend könnte die Permeabilisierung von Mitochondrien die Inaktivierung von cIAPs und folglich die Komplex IIb-vermittelte Induktion von Apoptose begünstigen. Allerdings konnte nach viraler Infektion zwar eine erhöhte Vulnerabilität der Mitochondrien beobachtet werden, aber nicht per se ein verstärktes Aufkommen mitochondrialer Proteine im Zytoplasma (**Abbildung 13, Abbildung 16** und nicht gezeigte Daten).

Nicht zuletzt spricht die Untersuchung der Proteinmengen von cIAP1 und TRAF2, bei der sich keine Reduktion nach viraler Infektion zeigte (**Abbildung 8**), gegen die Hypothese, dass die virale Infektion über cIAPs und TRAF2 Einfluss auf das Ubiquitinnetzwerk am TNFR1 nimmt.

Das Ubiquitinnetzwerk wird jedoch neben cIAPs und TRAF2 von vielen anderen Faktoren beeinflusst, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, wie den LUBAC-Komplex, A20 und CYLD (Weinlich and Green, 2014). Deshalb bleibt es weiterhin ein interessanter Ansatzpunkt für nachfolgende Untersuchungen.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass neben Veränderungen im Ubiquitinnetzwerk die Kinase NIK essentiell für die Bildung von TNFR-Komplex IIb ist (Boutaffala et al., 2015). In derselben Studie wurde eine Stabilisation NIK in Lebergewebe nach adenoviraler Infektion und eine Reduktion TNF-vermittelter viraler Hepatitis in NIK-defizienten Mäusen beobachtet. Dies lässt vermuten, dass NIK ein Schlüsselmolekül ist, über das die Infektion die Aktivierung von Caspase 8 bewirkt. Ungeklärt bleibt, wie es zur Stabilisation von NIK kommt. Denn eine Akkumulation von NIK ist nur als Folge einer Depletion von cIAPs oder TRAF2 bekannt, die andernfalls eine konstitutive proteasomale Degradation von NIK hervorrufen würden (Rauert et al., 2010; Varfolomeev et al., 2007). Wie bereits betont, bleiben die Protein-Mengen von cIAP1 und TRAF2 nach viraler Infektion jedoch unverändert.

Obwohl in einer Vielzahl von Studien davon ausgegangen wird, dass die TNFR1-vermittelte Apoptose mit der Aktivierung von Caspase 8 eingeleitet wird (Micheau and Tschopp, 2003; Ramakrishnan and Baltimore, 2011; Wang et al., 2008), ist auch das Szenario denkbar, dass dies nicht das initiale apoptotische Ereignis ist, sondern dass die Caspase 8-Aktivierung distal einer Permeabilisierung von Mitochondrien stattfindet. So könnte die Aktivierung von Caspase 8 durch Ausschüttung von mitochondrialem SMAC/HtrA2 und die Inhibition von IAPs ermöglicht werden oder in einem positiven Feedbackloop über die Spaltung durch Effektorcaspasen bewirkt werden (Ferreira et al., 2012; Slee et al., 1999; Yang et al., 2006).

XIAP kann CTL-Effektorfunktionen inhibieren und Todesrezeptor-vermittelte Apoptose verhindern (Cummins et al., 2004; Deveraux and Reed, 1999; Jost et al., 2009; Kashkar et al., 2006; Seeger et al., 2010). Verschiedene Studien beschreiben eine Sensibilisierung von XIAP-defizienten Zellen gegen Apoptose (Chawla-Sarkar et al., 2004; Sasaki et al., 2000). Eine Rolle von XIAP in der Virus-induzierten Sensibilisierung gegen TNF-vermittelte Apoptose konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die Deletion von XIAP nicht ausreichend war, um uninfizierte Mäuse für eine TNF-vermittelte Caspase 8- und 3-Aktivierung zu prädisponieren (**Abbildung 9**).

Nichtsdestoweniger hatte eine ektopische Überexpression von XIAP in infizierten Mäusen einen protektiven Effekt gegen TNF-vermittelte Apoptose. Da XIAP als direkter Inhibitor von Caspase 3, 7 und 9, nicht aber von Caspase 8 bekannt ist (Eckelman et al., 2006; Scott et al., 2005; Shiozaki et al., 2003; Stennicke et al., 2002), wurde durch die Überexpression eine Blockade im distalen apoptotischen TNFR-Signalweg erwartet. Überraschenderweise konnte so aber auch die Caspase 8-Aktivierung verhindert werden. Dies offenbart eine bislang unbekannte Funktion von XIAP in der Apoptose-Regulation proximal von Caspase 8.

Diese könnte auf der Redundanz zwischen XIAP und cIAPs beruhen. XIAP besitzt wie cIAPs Ubiquitinligase-Aktivität (Damgaard et al., 2012; Galban and Duckett, 2010), hat das Potential, RIPK1 zu ubiquitinylieren (Tenev et al., 2011), und könnte so cIAP1 und cIAP2 in der proximalen TNFR-Signaltransduktion ersetzen. Andererseits ist diese Funktion von XIAP mit der zuvor angesprochenen Hypothese vereinbar, dass ein Feedbackloop über Effektor-Caspasen nötig ist, um Caspase 8 vollständig zu aktivieren. In diesem Fall würde sich die Überexpression von XIAP durch die Inhibition von Effektor-Caspasen auf die Caspase 8-Aktivierung auswirken.

Obwohl letztendlich offen bleibt, über welchen Mechanismus eine virale Infektion in den TNFR1-Signalweg eingreift und so die Induktion von Apoptose begünstigt, konnte in dieser Arbeit eine Rolle von NFκB und XIAP ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu klären, welche Auswirkungen die virale Infektion auf proximale TNFR1-Signal-Komplexe, im Besonderen

TNFR-Komplex IIb, hat und inwieweit ein positiver Feedbackloop über Effektorcaspasen zur Caspase 8-Aktivierung beiträgt.

### **3. Die zellintrinsische Detektion der viralen Infektion erfolgt vermutlich unabhängig von klassischen innaten Immunrezeptoren, sondern über zellulären Stress.**

Die Sensibilisierung für eine TNF-vermittelte Hepatitis durch adenovirale Infektion konnte unabhängig von den viral codierten Transgenen, wie GFP und Ovalbumin, hervorgerufen werden (**Abbildung 2**). Dies zeigt, dass kein spezifischer, toxischer Effekt der Transgene verantwortlich zu machen ist. Außerdem kann ausgeschlossen werden, dass der TNF-vermittelten viralen Hepatitis eine adaptive Immunantwort gegen diese Transgene oder den adenoviralen Vektor zugrunde lag, da 48 h nach Infektion, zum Zeitpunkt der TNF-Injektion, noch keine endogene adaptive Immunantwort detektiert werden konnte (Wohlleber et al., 2012) und auch in B- und T-Zell-defizienten Mäusen eine TNF-vermittelte virale Hepatitis hervorgerufen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Stattdessen wird ein innater Mechanismus zur Detektion der Infektion als Basis für die Sensibilisierung für TNF-vermittelte virale Hepatitis vermutet.

In infizierten Zellen erfolgt die Erkennung einer Infektion in erster Instanz durch PRR, die das Virus anhand von hochkonservierten pathogenen Strukturen identifizieren.

Adenoviren, doppelsträngige DNA-Viren, werden durch TLR9 erkannt. Zusätzlich sind zytosolische Sensoren für die Erkennung viraler Nukleinsäuren und von Replikationsintermediaten zuständig (Zhu et al., 2007).

Wohlleber et al. (2012) konnten bereits durch den Einsatz von PRR-Agonisten zeigen, dass die Sensibilisierung für TNF-vermittelte Hepatitis nicht allein durch die Erkennung viraler Strukturen über PRR erreicht wird. In dieser Arbeit konnte darüber hinaus eine Beteiligung aller TLR und der zytosolischen Nukleinsäure-Sensoren STING und MDA5 an der Sensibilisierung für eine TNF-vermittelte



Hepatitis gänzlich ausgeschlossen werden (**Abbildung 10**). Zudem spricht auch die Unabhängigkeit von den zwei wichtigsten Effektoren der PRR-Stimulation, der Typ I-IFN und des ASC-abhängigen Inflammasoms, gegen eine Beteiligung von PRR.

Interessanterweise wird eine wechselseitige Beeinflussung von Todesrezeptor-Signaltransduktion und innater Immunerkennung vermutet, da TNFR-Adapterproteine, wie TRADD und RIPK1, auch in der Signaltransduktion von PRR eine Rolle spielen (Wilson et al., 2009). Darüber hinaus kann PRR-Stimulation direkt in Induktion von Zelltod münden. Dies kann bei TLRs über TRIF und die Rekrutierung von RIPK1 geschehen (Kaiser and Offermann, 2005). Eine Rolle von TRIF in der TNF-vermittelten viralen Hepatitis konnte in dieser Arbeit widerlegt werden.

Außerdem existiert eine inflammatorische Form des Zelltods (Pyroptose), die abhängig von Caspase 1 ist, dem zentralen Bestandteil von Inflammasomen (Lamkanfi and Dixit, 2014). Durch den Einsatz eines Caspase-1-Inhibitors konnte bestätigt werden, dass die TNF-induzierte virale Hepatitis unabhängig von klassischer, ASC-abhängiger Inflammasomaktivierung ist (Daten nicht gezeigt). Allerdings kann auch Caspase 11 nach Aktivierung in einem nicht-kanonischen, ASC-unabhängigen Inflammasom Pyroptose induzieren (Kayagaki et al., 2011). Formal kann also eine Rolle von Caspase 11 in der TNF-vermittelten viralen Hepatitis nicht ausgeschlossen werden. Jedoch wurde eine Aktivierung von Caspase 11 bisher vor allem als Antwort auf bakterielle Infektionen beobachtet (Jorgensen and Miao, 2015). Adenovirale Infektionen werden hingegen mit der Induktion eines ASC-abhängigen NLRP3-Inflammasoms in Verbindung gebracht (Barlan et al., 2011), wodurch eine Rolle von Caspase 11 in der Sensibilisierung für TNF-vermittelte virale Hepatitis sehr unwahrscheinlich ist.

Des Weiteren ist beschrieben worden, dass über das mitochondriale Protein MAVS Apoptose induziert werden kann (El Maadidi et al., 2014; Holm et al., 2007; Lei et al., 2009). MAVS ist ein essentieller Adapter im Signalweg der RLR, einer Gruppe zytosolischer Nukleinsäure-Sensoren (Wu and Chen, 2014). In dieser Arbeit wurde MDA5 als einziges Mitglied der RLR-Familie untersucht.

## V. Diskussion

Deshalb bleibt offen, ob RLR-Signaltransduktion über MAVS die Sensibilisierung für TNF-vermittelte Hepatitis bedingen könnte.

Vorläufige Experimente mit MAVS KO-Mäusen sprechen allerdings gegen eine Beteiligung von MAVS an der Sensibilisierung für TNF-vermittelte Hepatitis, da auch MAVS-defiziente Mäuse nach Infektion und TNF-Applikation einen Leberschaden entwickeln konnten (Daten nicht gezeigt).

Entsprechend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine Erkennung struktureller Komponenten des Virus über PRR nicht ausreicht, um eine Sensibilisierung der Hepatozyten für TNF-vermittelten Zelltod zu bedingen (Wohlleber et al., 2012) und deuten darüber hinaus darauf hin, dass PRR dafür nicht notwendig sind.

Dies wird zusätzlich durch Experimente mit UV-inaktiviertem AdGOL und LCMV unterstützt. Durch eine UV-Inaktivierung werden DNA-Replikation und Genexpression verhindert, die Strukturen im Virus-Partikel bleiben jedoch weitestgehend erhalten. Die UV-inaktivierten Viren konnten keine TNF-vermittelte Hepatitis induzieren (Wohlleber et al., 2012 und nicht gezeigte Daten). Somit kann eine Erkennung von Strukturen der Viruspartikel durch PRR als Ursache für die Sensibilisierung gegen TNF-vermittelte Hepatitis ausgeschlossen werden.

Wenn es nicht die Detektion der viralen Infektion durch PRR ist, die zur Sensibilisierung für eine TNF-vermittelte Hepatitis beiträgt, so stellt sich die Frage, welche initialen Reaktionen der Zelle auf die virale Infektion es stattdessen sein können. Die Tatsache, dass die Sensibilisierung neben dem Adenovirus auch durch LCMV, einem Virus einer anderen Familie, ausgelöst werden kann, weist auf einen universelleren Detektionsmechanismus hin.

Viren benutzen zelluläre Maschinerien und Ressourcen für ihren Lebenszyklus und strapazieren dabei die zelluläre Homöostase (He, 2006). Abweichungen von der zellulären Homöostase werden an den betroffenen Organellen detektiert und in Stress-Antworten umgesetzt. Deshalb wurde in Betracht gezogen und überprüft, ob die virale Infektion der Leber als Störfaktor der Homöostase durch zelluläre Stress-Antworten detektiert wird.

Im Unterschied zu anderen Studien, die nach viraler Infektion eine Induktion von ER-Stress durch die massive Produktion viraler Proteine zeigen (He, 2006; Zhang and Wang, 2012), konnte in den ersten 48h nach Infektion der Leber mit AdGOL keine ER-Stress-Antwort detektiert werden (**Abbildung 11 A, B**). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass durch die Deletion von E1 und E3 im hier verwendeten Adenovirus kaum adenovirale Proteine, sondern vorrangig nur die viral codierten Transgene in den infizierten Zellen exprimiert werden.

Nach adenoviraler Infektion konnte jedoch oxidativer Stress in Form eines erhöhten Vorkommens von reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffspezies (ROS/RNS) in der Leber beobachtet werden (**Abbildung 11 D**). Dies steht im Einklang mit verschiedenen Studien, die zeigen, dass virale Infektionen der Leber mit oxidativem Stress assoziiert sind (Loguercio and Federico, 2003; Okuda et al., 2002). Auch nach adenoviraler Infektion von Makrophagen ist eine Induktion von oxidativem Stress beschrieben worden, als dessen Ursache eine Produktion von mitochondrialen ROS postuliert wird (McGuire et al., 2011).

Eine Rolle mitochondrialer ROS in der Sensibilisierung für eine TNF-vermittelte virale Hepatitis konnte in dieser Arbeit jedoch durch Anwendung eines mitochondrialen Antioxidans ausgeschlossen werden (**Abbildung 15**).

Die Mitochondrien gelten als eine wichtige Quelle von ROS und sind ein Fokus ROS-vermittelter Schäden (Hill et al., 2012). Da allerdings nicht untersucht wurde, ob das verwendete mitochondriale Antioxidans MitoQ den Anstieg an ROS/RNS nach Infektion verhindert, kommen noch andere ROS/RNS-Quellen neben den Mitochondrien in Frage, wie das ER und Peroxisomen (Brown and Borutaite, 2012). Darüber hinaus könnten die ROS auch von anderen Leberzellen, wie residenten inflammatorischen Zellen stammen (Jaeschke et al., 1999).

Die Rolle von ROS in der Sensibilisierung für TNF-vermittelte virale Hepatitis konnte also nicht vollständig geklärt werden. Im Gegensatz dazu wurde bereits in früheren Studien gezeigt, dass im selben Hepatitis-Modell ROS für die Ausführung der TNF-vermittelten Apoptose nach viraler Infektion essentiell sind (Gärtner, 2011).

Neben oxidativem Stress wurde durch die Infektion mit AdGOL eine DNA-Schadens-Antwort (DDR) ausgelöst, die auf genotoxischen Stress im Sinne von DNA-Schädigung oder Replikationsfehlern schließen lässt (**Abbildung 11 C**). Viren, inklusive Adenoviren, sind als potentielle Auslöser einer DDR bekannt (Luftig, 2014; Stracker et al., 2002). Es erscheint jedoch überraschend, dass hier ein replikationsdefizientes, E1/E3-deletiertes Adenovirus eine DNA-Schadensantwort auslösen kann. Allerdings kann bei einem solchen Adenovirus in Abhängigkeit von E2 eine Replikation viraler DNA festgestellt werden (Rittner et al., 1997), die ausreichen könnte, um eine DDR zu induzieren (Nichols et al., 2009). Außerdem können auch strukturelle Komponenten, wie die adenovirale, lineare doppelsträngige DNA, eine DDR unabhängig von DNA-Replikation aktivieren (Luftig, 2014). Obwohl bekannt ist, dass auch RNA-Viren eine DDR auslösen können (Luftig, 2014), bleibt zu untersuchen, ob diese Stress-Antwort auch nach LCMV-Infektion induziert wird.

Stress-Antworten werden am Mitochondrium über die Regulation der mitochondrialen Permeabilität integriert und führen bei starkem Stress durch die Ausschüttung von proapoptotischen Proteinen des Intermembranraums (IMS) der Mitochondrien zur Induktion von Zelltod (Galluzzi et al., 2012a). Die mitochondriale Permeabilität kann dabei über p53, ROS und  $\text{Ca}^{2+}$  oder die Regulation von Proteinen der Bcl-2-Familie erhöht werden (Kroemer et al., 2007; Vaseva and Moll, 2009).

Die Bcl-2-Familie enthält pro- und antiapoptotische Mitglieder, die unter physiologischen Bedingungen miteinander im Gleichgewicht stehen (Youle and Strasser, 2008). Die virale Infektion der Leber und die damit verbundene Induktion von Stress-Antworten ging jedoch mit einer differentiellen Regulation von Bcl-2-Proteinen einher (**Abbildung 12**). Während antiapoptotische Bcl-2-Proteine unbeeinflusst blieben, stieg die Menge der proapoptotischen Mitglieder Bax und Bim an. Dies deutet auf ein Ungleichgewicht zugunsten von proapoptotischen Faktoren hin.

Im Falle von Bax konnte der Anstieg in der Proteinmenge auf eine Zunahme von Bax-mRNA zurückgeführt werden. Eine transkriptionelle Aktivierung von Bax und Bim durch p53, auch im Rahmen einer DDR und oxidativem Stress, wurde

bereits beobachtet (Happo et al., 2012; Miyashita and Reed, 1995; Steckley et al., 2007). Dies spricht für einen kausalen Zusammenhang zwischen dem beobachteten Stress und der Hochregulation von Bax und Bim nach viraler Infektion.

Das Bcl-2-Effektorprotein Bax liegt in gesunden Zellen hauptsächlich zytoplasmatisch vor, im Zuge seiner Aktivierung erfolgt seine Translokation zu den Mitochondrien, Konformationsänderung und Oligomerisierung, die eine Permeabilisierung der mitochondrialen Membran bewirkt (Desagher et al., 1999; Edlich et al., 2011; Wolter et al., 1997). Die Zunahme von Bax in der mitochondrialen Fraktion nach Infektion deutet auf einen erhöhten Aktivierungsstatus von Bax hin. Die Aktivierung von Bax unterliegt allerdings einem mehrstufigen Prozess, sodass nicht davon auszugehen ist, dass dies notwendigerweise mit einer Permeabilisierung der Mitochondrien einhergehen muss (Ghibelli and Diederich, 2010).

Diesbezüglich ist außerdem zu beachten, dass bei der Betrachtung der Proteinmenge - abgesehen von der Translokation von Bax - jegliche posttranslationale Regulation außer Acht gelassen wurde, welche einen sehr großen Einfluss auf Verfügbarkeit und Aktivität der Bcl-2-Proteine hat (Galluzzi et al., 2014; Happo et al., 2012). Somit ist es umso beeindruckender, dass sich allein auf Expressionsebene ein so deutlicher Effekt der Infektion auf das Bcl-2-Gleichgewicht abzeichnet.

Andererseits erklärt dies, warum nach Infektion trotz des Ungleichgewichts der Bcl-2-Proteine keine erhöhte Ausschüttung von mitochondrialen Proteinen ins Zytoplasma zu beobachten war (**Abbildung 13, Abbildung 16**). Denn vermutlich lagen die proapoptotischen Bcl-2-Proteine auch nach Infektion überwiegend in einem inaktiven Zustand vor. Dies verdeutlicht, dass eine virale Infektion eine Sensibilisierung gegen apoptotische Stimuli hervorruft, aber alleine nicht für eine Exekution der Apoptose ausreicht.

Zusammengenommen stellen die Ergebnisse dieser Arbeit die Notwendigkeit von PRR zur Sensibilisierung für eine TNF-vermittelte virale Hepatitis in Frage. Dagegen deuten sie auf eine Beteiligung von zellulärem Stress in der Detektion der viralen Infektion, im Speziellen von nicht-mitochondrialem oxidativen Stress und genotoxischem Stress, der unter anderem durch ein Ungleichgewicht

zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl2-Proteinen Einfluss auf die Mitochondrien nehmen könnte. Zu betonen ist, dass der Virus-bedingte zelluläre Stress allein nicht ausreicht, um spontan Apoptose zu induzieren, sondern dafür TNF als zusätzlicher Stimulus benötigt wird.

### **4. Mitochondrien: Der Schnittpunkt zwischen TNF-induzierter Apoptose und der Detektion viraler Infektionen.**

Hepatozyten werden bezüglich ihres Apoptosesignalwegs als Typ II-Zellen bezeichnet (Yin et al., 1999). Das bedeutet, dass in diesen Zellen mitochondriale Apoptosesignale essentiell für die Exekution des apoptotischen Zelltods sind (Scaffidi et al., 1998). Somit spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle in der TNFR-vermittelten Apoptose von Hepatozyten. Entscheidend ist dabei die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (OMM), die eine Ausschüttung von proapoptotischen Proteinen des Intermembranraums (IMS) zur Folge hat (Kroemer et al., 2007). Die Permeabilisierung der OMM (MOMP) kann durch extrinsische sowie intrinsische Faktoren induziert werden. Dementsprechend können am Mitochondrium der extrinsisch aktivierte proapoptotische TNFR-Signalweg und intrinsische zelluläre Stress-Antworten auf eine virale Infektion zusammentreffen.

Um zu untersuchen, ob die virale Infektion im Sinne eines intrazellulären Stressors auf die Mitochondrien einwirkt, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die Morphologie und respiratorische Funktion der Mitochondrien uninfizierter und infizierter Lebern verglichen.

Ovale Mitochondrien, wie sie in uninfiziertem Gewebe vorherrschten, sind typisch für Hepatozyten (Youle and van der Bliek, 2012). Im Kontrast dazu fanden sich in infiziertem Lebergewebe auch längere, tubuläre Mitochondrien (**Abbildung 13**). In verschiedenen Studien wird eine mitochondriale „Hyperfusion“ als Anpassungsreaktion auf zellulären Stress beschrieben (Gomes et al., 2011; Redpath et al., 2013; Tondera et al., 2009). Andererseits sind Mitochondrien durch die Lokalisation des RLR-Adapterproteins MAVS als Ort innater Immunerkennung bekannt (Seth et al., 2005). Im Hinblick darauf wurde gezeigt,

dass eine RLR-Aktivierung mit einer Elongation von Mitochondrien einhergeht (Castanier et al., 2010; Ishikawa and Barber, 2008).

Dementsprechend könnte das Auftreten tubulärer Mitochondrien im infizierten Lebergewebe entweder als eine Folge einer Aktivierung innater Immunrezeptoren oder als eine Adaption der Mitochondrien an zellulären Stress angesehen werden.

Die respiratorische Funktion isolierter Mitochondrien war nach viraler Infektion der Leber deutlich beeinträchtigt (**Abbildung 14**), was sich in zwei verschiedenen respiratorischen Parametern manifestierte. Einerseits äußerte sich dies in einem verminderten Respiratorischen Kontrollquotienten (RCR). Da der RCR durch viele Aspekte der oxidativen Phosphorylierung beeinflusst wird, gilt er als ein guter Indikator für eine mitochondriale Dysfunktion (Brand and Nicholls, 2011).

Andererseits zeigte sich eine Beeinträchtigung der Respiration durch die Infektion in Form einer stark erniedrigten FCCP-abhängigen Atmung. FCCP wirkt als Entkoppler der Atmung vom elektrochemischen Gradienten und wird so zur Stimulation der maximalen Respiration eingesetzt. Die Reduktion der FCCP-abhängigen Atmung deutet auf eine geringere respiratorische Kapazität und erhöhte Auslastung der respiratorischen Funktion von Mitochondrien nach viraler Infektion hin.

Mitochondriale respiratorische Dysfunktionen können durch Schädigungen der Atmungskettenenzyme oder indirekt über Schädigungen mitochondrialer DNA durch oxidativen Stress hervorgerufen werden (Dranka et al., 2011; Hill et al., 2012). Das mitochondriale Antioxidans MitoQ konnte zwar eine TNF-vermittelte Hepatitis nicht verhindern (**Abbildung 15**), dies impliziert jedoch nicht, dass nicht ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von oxidativem Stress und der respiratorischen Dysfunktion von Mitochondrien nach Infektion besteht. Denkbar wäre auch, dass metabolischer Stress, ausgelöst durch einen erhöhten Nährstoff- und Energiebedarf in Folge der Infektion, zu veränderter bioenergetischer Funktion der Mitochondrien beiträgt (Jones and Thompson, 2009; Shenk and Alwine, 2014).

Insgesamt konnten also mitochondriale Veränderungen in Morphologie und respiratorischer Funktion nach viraler Infektion festgestellt werden, die als Reaktionen der Mitochondrien auf zellulären Stress und innate Immunrezeption interpretiert werden können. Es bleibt allerdings ungeklärt, ob diese mitochondrialen Veränderungen zur Sensibilisierung der infizierten Hepatozyten für TNF-vermittelten Zelltod beitragen.

In Hinblick auf die Sensibilisierung der infizierten Hepatozyten für TNF-vermittelten Zelltod war von besonderem Interesse, ob die virale Infektion auch apoptotische Funktionen von Mitochondrien beeinflusst. Tatsächlich zeigten Untersuchungen der Mitochondrien-Permeabilisierung in Antwort auf verschiedene proapoptotische Trigger eine erhöhte Vulnerabilität der Mitochondrien infizierter Lebern (**Abbildung 16**). Dies betraf zwei verschiedene Mechanismen der Mitochondrien-Permeabilisierung. Der eine Mechanismus, nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation, wurde durch mitochondriale Permeabilitäts-Transition (mPT) ausgeführt, die mit einer Abnahme der Integrität der inneren mitochondrialen Membran (IMM) und folglich einem Membranpotentialverlust und dem Anschwellen der Mitochondrien einhergeht (Bonora and Pinton, 2014). Der andere Mechanismus, ausgelöst durch eine Stimulation mit tBid, bewirkte hingegen ohne Anzeichen einer Schädigung der IMM eine Ausschüttung von mitochondrialen Proteinen. Letzteres spricht für eine exklusive Permeabilisierung der OMM durch Bcl-2-regulierte MAC-Kanäle (Dejean et al., 2006; Martinez-Caballero et al., 2005).

Die verstärkte Vulnerabilität der Mitochondrien nach viraler Infektion kann durch die erhöhte Expression von Bim und Bax erklärt werden. Zusätzlich ist eine Beteiligung von p53 möglich, welches nicht nur für die Transkription proapoptotischer Bcl-2-Proteine verantwortlich ist, sondern die Permeabilisierung der Mitochondrien auch direkt begünstigen kann (Mihara et al., 2003). P53 wird im Rahmen vieler zellulärer Stress-Antworten aktiviert (Horn and Vousden, 2007) und interessanterweise wurde dessen Aktivierung auch nach Infektion der Leber mit einem E1- und E3-deletierten Adenovirus beobachtet (Kubicka et al., 1999).



Da mPT und MAC in der erhöhten Mitochondrien-Vulnerabilität eine Rolle spielen, war von Interesse, ob sie auch *in vivo* im Rahmen der TNF-vermittelten Apoptose infizierter Hepatozyten relevant sind.

Die starke Reduktion der TNF-vermittelten viralen Hepatitis durch Cyclosporin A (CsA) demonstriert eine große Relevanz der mPT in diesem Modell. Durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator konnte die Hepatitis etwa im selben Ausmaß verringert werden. Dies lässt vermuten, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale über die Induktion der mPT wirken. Diese Beobachtung ist im Einklang mit einzelnen Studien, die eine Einleitung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen und eine Erhöhung der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Rahmen der apoptotischen TNFR1-Signaltransduktion zeigen (Lao and Chang, 2008; Pu et al., 2002).

Dies wirft jedoch die Frage auf, wie eine TNFR1-Stimulation die Induktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen bewirken kann. Das ER und die Mitochondrien stellen den größten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher dar und stehen zur Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in engem Kontakt miteinander. So kann ein schneller Transfer von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER zu den Mitochondrien erfolgen (Rizzuto et al., 2009). An der ER-Membran lokalisierte Bcl-2-Proteine kontrollieren dabei die Aktivität von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (Ryu et al., 2010; Scorrano et al., 2003). So könnte theoretisch von Caspase 8 aktiviertes tBid durch die Unterstützung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstroms aus dem ER die Induktion einer mPT bewirken. Tatsächlich konnte in primären Hepatozyten eine Beteiligung von Bid an der mPT-Induktion nach TNFR-Stimulation bereits gezeigt werden (Zhao et al., 2003). Dies steht nicht im Widerspruch zu den Daten der vorliegenden Arbeit und diverser früherer Studien, die eine Induktion der mPT durch tBid unter Verwendung isolierter Mitochondrien widerlegen (Kim et al., 2000; Quinsay et al., 2010; Scorrano et al., 2002; Shimizu and Tsujimoto, 2000; Wei et al., 2000). Denn Auswirkungen, die Bid *in vivo* indirekt über andere Zellorganellen auf die Mitochondrien hat, können durch Versuche mit isolierten Mitochondrien nicht erfasst werden.

Darüber hinaus ist zu vermuten, dass sich die Zunahme von Bax nach Infektion nicht nur in den Mitochondrien (**Abbildung 12**), sondern ebenso in der ER-Membran zeigt und so den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER begünstigt (Oakes et al., 2003; Scorrano et al., 2003).

## V. Diskussion

Die TNF-vermittelte virale Hepatitis konnte durch einen mPT-Inhibitor oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator zwar stark reduziert, aber nicht komplett inhibiert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass CsA in der verwendeten Dosis und Applikationsart keine komplette Inhibition der mPT erreicht hat (Bernardi et al., 2006).

Andererseits könnte dieses Ergebnis bedeuten, dass zusätzlich noch ein anderer Mechanismus existiert, der für 30% der Leberschädigung in der TNF-vermittelten viralen Hepatitis verantwortlich ist. Da die mitochondriale Permeabilisierung essentiell für die Apoptose von Hepatozyten ist, könnte es sich um eine nicht-apoptotische Form des Zelltods handeln, die unabhängig von Mitochondrien erfolgt, wie die Nekroptose (Galluzzi et al., 2014; Tait et al., 2013), oder um einen CsA- und  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Mechanismus der Mitochondrien-Permeabilisierung, wie die MAC-Kanäle. Letztere Hypothese wird durch Studien an primären Hepatozyten und *in-vivo*-Modellen von Leberschädigung unterstützt, die eine kombinierte Beteiligung von mPT und MAC an der Mitochondrien-Permeabilisierung zeigen (Guihard et al., 2004; Zhao et al., 2003).

Im Hinblick auf diese Studien unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Annahme, dass in der TNF-vermittelten viralen Hepatitis sowohl mPT als auch – obwohl in geringerem Maße – MAC die Permeabilisierung der Mitochondrien verantworten.

Die mPT und vermutlich auch MAC-Kanäle spielen dementsprechend einerseits eine wichtige Rolle in der Exekution der TNF-vermittelten Apoptose nach Infektion, vermitteln andererseits eine erhöhte Vulnerabilität der Mitochondrien nach viraler Infektion.

Somit konnte bestätigt werden, dass das Mitochondrium, genauer die Permeabilisierung seiner Membran, ein Schnittpunkt von zellulären Reaktionen auf die virale Infektion und dem proapoptotischen TNFR-Signalweg darstellt. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die erhöhte Vulnerabilität der Leber-Mitochondrien in der Sensibilisierung der infizierten Hepatozyten für TNF-vermittelten Zelltod eine Rolle spielt.

Letztendlich bleibt jedoch offen, welche Relevanz die erhöhte Vulnerabilität der Mitochondrien nach Infektion auf die TNF-vermittelte Apoptose hat. So ist es

möglich, dass sie einen quantitativen Effekt auf die proapoptotische TNFR-Signaltransduktion hat, indem sie Apoptosesignale verstärkt und dadurch die Exekution der Apoptose beschleunigt. Andererseits könnte sie sogar einen qualitativen Effekt haben, indem sie nötig ist, um die Exekution der Apoptose infizierter Hepatozyten zu ermöglichen.

Letzteres würde für die Annahme sprechen, dass die Mitochondrien im Fokus eines zwei-Treffer-Systems stehen: Sowohl die Infektion (Treffer 1) als auch proapoptotische TNFR-Signale (Treffer 2) müssen auf die Mitochondrien „eintreffen“, um den Hepatozyten in die Apoptose zu treiben.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit folgendes Modell für den molekularen Mechanismus der TNF-vermittelten Apoptose virusinfizierter Hepatozyten (**Abbildung IV**):

Die virale Infektion begünstigt und beschleunigt TNFR1-vermittelte Todes-Signale in zwei Instanzen, den Mitochondrien und den proximalen TNFR-Komplexen, die durch wechselseitige Verstärkung zum Eintritt des Zelltods führen:

1. Virus-induzierte Stress-Antworten werden am Mitochondrium integriert und führen zu einem Ungleichgewicht von pro- zu antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen z. B. durch Hochregulation von Bax. Dies bedingt eine gesteigerte Vulnerabilität der Mitochondrien.
2. Außerdem führt die virale Infektion zur Überwindung eines Apoptose-Checkpoints im proximalen TNFR1-Signalweg, sodass die Aktivierung von Initiator-Caspase 8 im TNFR1-Komplex IIb ermöglicht wird. Caspase 8 spaltet Bid, welches proapoptotische Bcl-2-Effektorproteine wie Bax aktiviert. Diese begünstigen über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus dem ER die mPT und kontrollieren die Formation von MAC-Kanälen.

In Kombination mit TNFR1-Signalen bewirkt die virale Infektion durch die erhöhte Vulnerabilität der Mitochondrien folglich ihre Permeabilisierung (MOMP) und eine Ausschüttung mitochondrialer IMS-Proteine wie Cytochrom C, SMAC und HtrA2, welche für die Aktivierung von Effektor-Caspasen und die

Inhibition von IAPs benötigt werden und unter Umständen in einem positivem Feedbackloop die Aktivierung von Caspase 8 steigern.

Die TNFR1-vermittelte NFκB-Aktivierung bleibt unbeeinträchtigt.

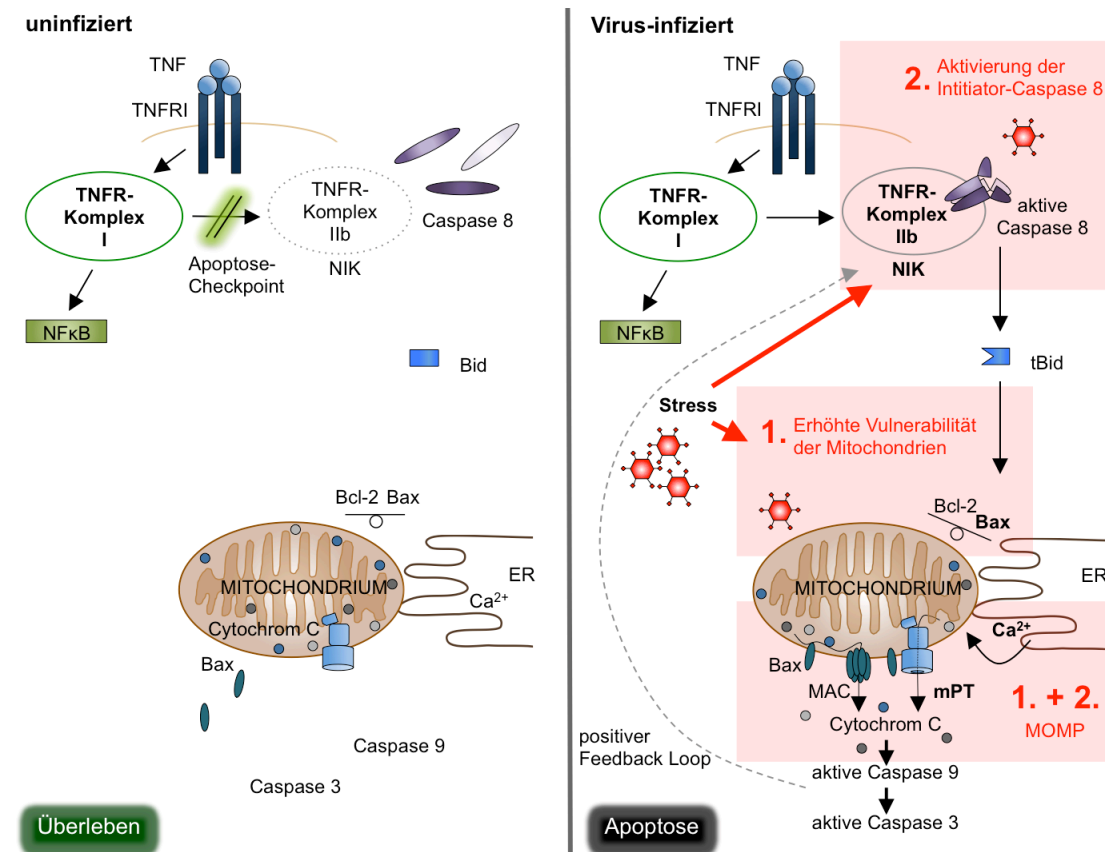


Abbildung IV: Schematische Darstellung eines Modells zum Mechanismus der TNF-vermittelten Apoptose virusinfizierter Hepatozyten.

## 5. Bedeutung der TNF-vermittelten Eliminierung infizierter Hepatozyten für die Pathogenese viraler Hepatitiden.

CTL haben eine zentrale Funktion in der Kontrolle von HBV- und HCV-Infektionen (Bertoletti and Maini, 2000; Shoukry et al., 2003; Thimme et al., 2003). Sie können durch Zytokine die Viren intrazellulär inaktivieren (Guidotti et al., 1996) und durch zytotoxische Effektorfunktionen infizierte Zellen eliminieren (Guidotti and Chisari, 2006; Thimme et al., 2003). Gleichzeitig tragen CTL

durch die Gewebeschädigung, die sie so vermitteln, maßgeblich zur HBV- und HCV-assoziierten Leberpathologie bei. Diese kann bei einer akuten Hepatitis einen fulminanten Verlauf mit Leberversagen bewirken (Ando et al., 1993). In chronischen Infektionen schafft die kontinuierliche Induktion von Zelltod und die kompensatorische Regeneration eine proliferative und inflammatorische Umgebung, die eine Entstehung der Folgeerkrankungen Fibrose, Zirrhose und Krebs begünstigen (Guicciardi et al., 2013; Guidotti and Chisari, 2006; Hikita et al., 2012). Dementsprechend haben CTL je nach Mikroumgebung und funktionaler Kapazität eine schützende oder schädigende Wirkung (Bertoletti and Maini, 2000).

Dass dementsprechend auch die TNF-vermittelte Eliminierung infizierter Hepatozyten sowohl an pathologischen als auch protektiven Effekten auf die Leber maßgeblich beteiligt ist, ist wahrscheinlich. Denn die TNF-vermittelte Eliminierung infizierter Hepatozyten durch CTL macht 40% ihrer zytotoxischen Effektorfunktion aus (Wohlleber et al., 2012).

Beobachtungen von erhöhten TNF-Serumspiegeln in viralen und inflammatorischen Lebererkrankungen sowie bei fulminantem Leberversagen sprechen für pathologische Effekte von TNF (Streetz et al., 2000; Tilg and Diehl, 2000; Zhang et al., 1993). Zwar sind im vorliegenden Modell nur einzelne der infizierten Zellen von der TNF-vermittelten Apoptose betroffen (**Abbildung 1 D, Abbildung 4 B**), doch kann Apoptose einen proinflammatorischen Reiz darstellen und so im Zusammenspiel mit anderen Immuneffektoren eine deutlich stärkere Leberschädigung nach sich ziehen (Ando et al., 1994; Guidotti and Chisari, 2006). Andererseits konnte gezeigt werden, dass TNF zur Kontrolle von LCMV-Infektionen der Leber beiträgt (Wohlleber et al., 2012) und Therapien, die TNF neutralisieren, zu einer Reaktivierung von HBV in Patienten mit chronischer HBV-Infektion führen können (Chung et al., 2009; Lan et al., 2011). Dies spricht für eine protektive Rolle von TNF, wobei allerdings nicht zwischen zytotoxischen und nicht-zytotoxischen Effekten von TNF auf das Virus unterschieden werden kann (Guidotti et al., 1996).

Ob in die eine oder andere Richtung, eine pharmakologische Einflussnahme auf die Apoptose virusinfizierter Hepatozyten stellt eine vielversprechende therapeutische Strategie dar, um virale Infektionen der Leber zu bekämpfen bzw. akute Hepatitis und Folgeerkrankungen chronischer Infektionen zu verhindern (Guicciardi et al., 2013). Die molekularen Mechanismen hinter der TNF-vermittelten viralen Hepatitis zu verstehen wird bei der Identifikation von geeigneten pharmakologischen Zielmolekülen helfen.

Erste Ansatzpunkte hierzu liefern die Daten zur therapeutischen Intervention mit Calciumsignalen und der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition (mPT) **(Abbildung 18)**: Der Calciumchelator BABTA und der mPT-Inhibitor CsA konnten die TNF-vermittelte virale Hepatitis stark reduzieren.

In der Viruskontrolle nimmt die TNF-vermittelte Apoptose infizierter Hepatozyten eine besondere Rolle ein, weil sie unabhängig von innatem Immunsignalen über PRR und Typ-I IFN ist. Darüber hinaus ist keine direkte MHC I-Antigenpräsentation durch infizierte Hepatozyten nötig, um deren gezielte TNF-vermittelte Tötung durch CTL zu ermöglichen. Stattdessen ist eine Kreuzpräsentation viraler Antigene durch sinusoidale Endothelzellen der Leber an die Virus-spezifischen CTL ausreichend (Wohlleber et al., 2012).

Somit könnte die TNF-vermittelte Apoptose Immunevasions-Mechanismen von Viren, also Strategien, der klassischen Immunerkennung zu entkommen, umgehen. Zu diesen Strategien gehört, dass Viren ihrer Erkennung durch PRR entgegenwirken (Bowie and Unterholzner, 2008). So kann ein durch HCV kodiertes Protein MAVS und TRIF spalten und dadurch TLR- und RLR-Signale hemmen (Li et al., 2005; Meylan et al., 2005). Außerdem können HBV und HCV mit der Typ-I IFN-Produktion oder -Signalen interferieren und dadurch eine Hochregulation der MHC I-Expression in infizierten Hepatozyten verhindern (Gale et al., 1997; Taylor et al., 1999; Twu et al., 1988). Andere Viren haben Strategien entwickelt, direkt in die MHC I-Antigenpräsentation einzugreifen, indem sie beispielsweise die Beladung der MHC I-Moleküle oder deren Transport an die Zelloberfläche verhindern (Antoniou and Powis, 2008).

Diesen Immunevasions-Strategien entgeht die TNF-vermittelte Eliminierung infizierter Hepatozyten.

Allerdings beeinflussen HBV und HCV auch TNFR1-abhängige Signale sowohl im pro- als auch im antiapoptotischen Sinne (Herzer et al., 2007; Yoon and Gores, 2002). Beispielsweise begünstigen sie einerseits die protektive NFκB-Aktivierung (Kim et al., 2001; Marusawa et al., 1999; Pan et al., 2001). Andererseits wurde aber eine Sensibilisierung von Zellen nach HCV-Infektion oder Transfektion mit HBx gegen TNF-vermittelte Apoptose beobachtet (Su and Schneider, 1997; Zhu et al., 1998). Es ist deshalb unsicher, welche Relevanz die TNF-vermittelte Apoptose HBV- oder HCV-infizierter Hepatozyten hat und welche Effekte ein therapeutisches Eingreifen hätte. In dieser Hinsicht ist es erstrebenswert, die TNFR1-Signaltransduktion in HBV- und HCV-infizierten Hepatozyten zu untersuchen.

## **6. Die TNF-vermittelte virale Hepatitis als experimentelles Modell für immunvermittelte Leberschädigung.**

Es existieren diverse Modelle für TNF-vermittelte Leberschädigung, denen sehr unterschiedliche molekulare Mechanismen zu Grunde liegen. In verschiedenen TNF-abhängigen Hepatitis-Modellen, in denen T-Zellen und Kupfferzellen unspezifisch durch ein Mitogen (Concavalin A) oder ein bakterielles Toxin (PEA) aktiviert werden, konnte eine Abhängigkeit von beiden TNF-Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, gezeigt werden (Schumann et al., 2003). Die TNF-vermittelte virale Hepatitis wird jedoch allein über TNFR1 induziert (**Abbildung 3**). Genauso konnte auch für eine Galactosamin (GalN)/LPS-induzierte Hepatitis gezeigt werden, dass eine Deletion von TNFR1 ausreicht, um vor einer Leberschädigung zu schützen (Dejager and Libert, 2008). Dieser deutliche mechanistische Unterschied zu den zuvor genannten Modellen beruht wahrscheinlich auf einer zellintrinsischen Sensibilisierung der Hepatozyten für die proapoptotischen TNFR1-Signale durch GalN bzw. durch die virale Infektion, die bei den TNFR2-abhängigen Modellen fehlt. Im Bezug auf die Sensibilisierung für die TNFR1-vermittelte Apoptose unterscheiden sich die GalN/LPS-induzierte und die Virus/TNF-induzierte Leberschädigung jedoch grundlegend: Während GalN in den Hepatozyten die Transkription inhibiert (Tiegs et al., 1989) und somit NFκB-abhängige antiapoptotische Mechanismen außer Kraft setzt, erfolgt die

Sensibilisierung durch eine virale Infektion unabhängig einer NFκB-Inhibition **(Abbildung 5)**.

Insgesamt verdeutlichen diese Unterschiede zwischen dem Modell der TNF-vermittelten viralen Hepatitis zu anderen Modellen immunvermittelter Leberschädigung, wie wichtig es ist, ein experimentelles Modell zu wählen, das der physiologischen bzw. pathologischen Situation möglichst nahe kommt.

Eine virale Infektion liegt vielen Lebererkrankungen zu Grunde. Auch wenn hepatotrope Viren mit Überlebens- bzw. Zelltodsignalwegen der Wirtszelle gezielt interferieren (Herzer et al., 2007; Yoon and Gores, 2002) und somit der verwendete adenovirale Vektor die pathologische Situation nur stark vereinfacht simuliert, ist dieses Modell deutlich weniger artifiziell als die bekannten Alternativen.

Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass sich das vorliegende Modell der TNF-vermittelten viralen Hepatitis für Untersuchungen bezüglich Medikamenten-induzierter Leberschädigung (DILI<sup>72</sup>) eignet, da in diesem Modell die Mitochondrien eine zentrale Rolle spielen und der DILI häufig eine mitochondriale Dysfunktion zugrunde liegt (Begriffe et al., 2011).

---

<sup>72</sup> engl.: drug induced liver injury



## VI. Literaturverzeichnis

- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143-150.
- Alavian, K.N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., Park, H.A., Licznanski, P., Li, H., Nabili, P., Hockensmith, K., Graham, M., *et al.* (2014). An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 10580-10585.
- Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 126, 32-41.
- Ando, K., Guidotti, L.G., Wirth, S., Ishikawa, T., Missale, G., Moriyama, T., Schreiber, R.D., Schlicht, H.J., Huang, S.N., and Chisari, F.V. (1994). Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *J Immunol* 152, 3245-3253.
- Ando, K., Moriyama, T., Guidotti, L.G., Wirth, S., Schreiber, R.D., Schlicht, H.J., Huang, S.N., and Chisari, F.V. (1993). Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 178, 1541-1554.
- Antoniou, A.N., and Powis, S.J. (2008). Pathogen evasion strategies for the major histocompatibility complex class I assembly pathway. *Immunology* 124, 1-12.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J., and Molkenin, J.D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9, 550-555.
- Barlan, A.U., Griffin, T.M., McGuire, K.A., and Wiethoff, C.M. (2011). Adenovirus membrane penetration activates the NLRP3 inflammasome. *Journal of virology* 85, 146-155.
- Barry, M., Heibein, J.A., Pinkoski, M.J., Lee, S.F., Moyer, R.W., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 20, 3781-3794.
- Basanez, G., Soane, L., and Hardwick, J.M. (2012). A new view of the lethal apoptotic pore. *PLoS Biol* 10, e1001399.
- Begriffe, K., Massart, J., Robin, M.A., Borgne-Sanchez, A., and Fromenty, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol* 54, 773-794.
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blachly-Dyson, E., Di Lisa, F., and Forte, M.A. (2006). The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J* 273, 2077-2099.

## VI. Literaturverzeichnis

- Bertoletti, A., and Maini, M.K. (2000). Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? *Curr Opin Microbiol* 3, 387-392.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., *et al.* (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Bonora, M., and Pinton, P. (2014). The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Front Oncol* 4, 302.
- Bonora, M., Wieckowski, M.R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L., and Pinton, P. (2015). Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene* 34, 1475-1486.
- Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., and Griffiths, G.M. (2002). The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev* 189, 152-160.
- Boutaffala, L., Bertrand, M.J., Remouchamps, C., Seleznik, G., Reisinger, F., Janas, M., Benezech, C., Fernandes, M.T., Marchetti, S., Mair, F., *et al.* (2015). NIK promotes tissue destruction independently of the alternative NF- $\kappa$ B pathway through TNFR1/RIP1-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*.
- Bowie, A.G., and Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 8, 911-922.
- Brand, M.D., and Nicholls, D.G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435, 297-312.
- Broering, R., Lu, M., and Schlaak, J.F. (2011). Role of Toll-like receptors in liver health and disease. *Clin Sci (Lond)* 121, 415-426.
- Brown, G.C., and Borutaite, V. (2012). There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* 12, 1-4.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.
- Castanier, C., Garcin, D., Vazquez, A., and Arnoult, D. (2010). Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep* 11, 133-138.
- Chan, F.K., and Lenardo, M.J. (2000). A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30, 652-660.
- Chan, F.K., Luz, N.F., and Moriwaki, K. (2015). Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annu Rev Immunol* 33, 79-106.
- Chance, B., and Williams, G.R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* 217, 409-427.
- Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R., and Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6, 15-25.

- Chawla-Sarkar, M., Bae, S.I., Reu, F.J., Jacobs, B.S., Lindner, D.J., and Borden, E.C. (2004). Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 11, 915-923.
- Christofferson, D.E., Li, Y., and Yuan, J. (2014). Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase. *Annu Rev Physiol* 76, 129-150.
- Chung, S.J., Kim, J.K., Park, M.C., Park, Y.B., and Lee, S.K. (2009). Reactivation of hepatitis B viral infection in inactive HBsAg carriers following anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *J Rheumatol* 36, 2416-2420.
- Crispe, I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 27, 147-163.
- Crompton, M., Ellinger, H., and Costi, A. (1988). Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 255, 357-360.
- Csomos, R.A., Brady, G.F., and Duckett, C.S. (2009). Enhanced cytoprotective effects of the inhibitor of apoptosis protein cellular IAP1 through stabilization with TRAF2. *J Biol Chem* 284, 20531-20539.
- Cummins, J.M., Kohli, M., Rago, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Bunz, F. (2004). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells. *Cancer Res* 64, 3006-3008.
- Damgaard, R.B., Nachbur, U., Yabal, M., Wong, W.W., Fiil, B.K., Kastirr, M., Rieser, E., Rickard, J.A., Bankovacki, A., Peschel, C., *et al.* (2012). The ubiquitin ligase XIAP recruits LUBAC for NOD2 signaling in inflammation and innate immunity. *Mol Cell* 46, 746-758.
- Danthinne, X., and Imperiale, M.J. (2000). Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* 7, 1707-1714.
- Dare, A.J., Bolton, E.A., Pettigrew, G.J., Bradley, J.A., Saeb-Parsy, K., and Murphy, M.P. (2015). Protection against renal ischemia-reperfusion injury in vivo by the mitochondria targeted antioxidant MitoQ. *Redox Biol* 5, 163-168.
- Dejager, L., and Libert, C. (2008). Tumor necrosis factor alpha mediates the lethal hepatotoxic effects of poly(I:C) in D-galactosamine-sensitized mice. *Cytokine* 42, 55-61.
- Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., and Kinnally, K.W. (2006). Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis? *Cell Death Differ* 13, 1387-1395.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144, 891-901.
- Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 870-879.
- Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & development* 13, 239-252.

## VI. Literaturverzeichnis

- Dondelinger, Y., Aguilera, M.A., Goossens, V., Dubuisson, C., Grootjans, S., Dejardin, E., Vandenabeele, P., and Bertrand, M.J. (2013). RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition. *Cell Death Differ* 20, 1381-1392.
- Dranka, B.P., Benavides, G.A., Diers, A.R., Giordano, S., Zelickson, B.R., Reily, C., Zou, L., Chatham, J.C., Hill, B.G., Zhang, J., *et al.* (2011). Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic Biol Med* 51, 1621-1635.
- Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., and Scott, F.L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 7, 988-994.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104-116.
- El Maadidi, S., Faletti, L., Berg, B., Wenzl, C., Wieland, K., Chen, Z.J., Maurer, U., and Borner, C. (2014). A novel mitochondrial MAVS/Caspase-8 platform links RNA virus-induced innate antiviral signaling to Bax/Bak-independent apoptosis. *J Immunol* 192, 1171-1183.
- Everett, H., and McFadden, G. (1999). Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol* 7, 160-165.
- Ferreira, K.S., Kreutz, C., Macnelly, S., Neubert, K., Haber, A., Bogyo, M., Timmer, J., and Borner, C. (2012). Caspase-3 feeds back on caspase-8, Bid and XIAP in type I Fas signaling in primary mouse hepatocytes. *Apoptosis* 17, 503-515.
- Fotin-Mleczeck, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J.A., and Wajant, H. (2002). Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci* 115, 2757-2770.
- Galban, S., and Duckett, C.S. (2010). XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death Differ* 17, 54-60.
- Gale, M.J., Jr., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230, 217-227.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., and Kroemer, G. (2014). Organelle-specific initiation of cell death. *Nat Cell Biol* 16, 728-736.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Alnemri, E.S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., *et al.* (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* 22, 58-73.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., and Kroemer, G. (2012a). Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res* 111, 1198-1207.
- Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14, 1237-1243.

- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., *et al.* (2012b). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107-120.
- Gärtner, K. (2011). Mechanismen der hepatischen Immunregulation. In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät (Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn).
- Ghibelli, L., and Diederich, M. (2010). Multistep and multitask Bax activation. *Mitochondrion* 10, 604-613.
- Gilles, P.N., Fey, G., and Chisari, F.V. (1992). Tumor necrosis factor alpha negatively regulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice. *Journal of virology* 66, 3955-3960.
- Gnaiger (2014). Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis. (Mitochondr Physiol Network 19.12. OROBOROS MiPNet Publications).
- Gomes, L.C., Di Benedetto, G., and Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13, 589-598.
- Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., *et al.* (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793-802.
- Guicciardi, M.E., Malhi, H., Mott, J.L., and Gores, G.J. (2013). Apoptosis and necrosis in the liver. *Compr Physiol* 3, 977-1010.
- Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 19, 65-91.
- Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 1, 23-61.
- Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Hobbs, M.V., Matzke, B., Schreiber, R., and Chisari, F.V. (1996). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 4, 25-36.
- Guihard, G., Bellot, G., Moreau, C., Pradal, G., Ferry, N., Thomy, R., Fichet, P., Meflah, K., and Vallette, F.M. (2004). The mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) corresponds to a late apoptotic event. *J Biol Chem* 279, 46542-46550.
- Gutierrez-Aguilar, M., Douglas, D.L., Gibson, A.K., Domeier, T.L., Molkentin, J.D., and Baines, C.P. (2014). Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition. *J Mol Cell Cardiol* 72, 316-325.
- Haas, T.L., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Schmukle, A.C., Cordier, S.M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., *et al.* (2009). Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell* 36, 831-844.

## VI. Literaturverzeichnis

- Hansen, J.M., Go, Y.M., and Jones, D.P. (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 215-234.
- Happo, L., Strasser, A., and Cory, S. (2012). BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *J Cell Sci* 125, 1081-1087.
- Hausenloy, D.J., Boston-Griffiths, E.A., and Yellon, D.M. (2012). Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent. *Br J Pharmacol* 165, 1235-1245.
- He, B. (2006). Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ* 13, 393-403.
- Herzer, K., Sprinzl, M.F., and Galle, P.R. (2007). Hepatitis viruses: live and let die. *Liver Int* 27, 293-301.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 89-102.
- Hikita, H., Kodama, T., Shimizu, S., Li, W., Shigekawa, M., Tanaka, S., Hosui, A., Miyagi, T., Tatsumi, T., Kanto, T., *et al.* (2012). Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. *J Hepatol* 57, 92-100.
- Hill, B.G., Benavides, G.A., Lancaster, J.R., Jr., Ballinger, S., Dell'Italia, L., Jianhua, Z., and Darley-Usmar, V.M. (2012). Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol Chem* 393, 1485-1512.
- Hohmann, H.P., Remy, R., Brockhaus, M., and van Loon, A.P. (1989). Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha). *J Biol Chem* 264, 14927-14934.
- Holm, G.H., Zurney, J., Tumilasci, V., Leveille, S., Danthi, P., Hiscott, J., Sherry, B., and Dermody, T.S. (2007). Retinoic acid-inducible gene-I and interferon-beta promoter stimulator-1 augment proapoptotic responses following mammalian reovirus infection via interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem* 282, 21953-21961.
- Horn, H.F., and Vousden, K.H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26, 1306-1316.
- Hunter, D.R., and Haworth, R.A. (1979). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 195, 453-459.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674-678.
- Iwasaki, A. (2012). A virological view of innate immune recognition. *Annual review of microbiology* 66, 177-196.
- Jackson, C.E., Fischer, R.E., Hsu, A.P., Anderson, S.M., Choi, Y., Wang, J., Dale, J.K., Fleisher, T.A., Middleton, L.A., Sneller, M.C., *et al.* (1999). Autoimmune lymphoproliferative

- syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am J Hum Genet* 64, 1002-1014.
- Jaeschke, H., Ho, Y.S., Fisher, M.A., Lawson, J.A., and Farhood, A. (1999). Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology* 29, 443-450.
- Jiang, X., and Wang, X. (2004). Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 73, 87-106.
- Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & development* 23, 537-548.
- Jorgensen, I., and Miao, E.A. (2015). Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunological reviews* 265, 130-142.
- Jost, P.J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M.D., Nachbur, U., Huang, D.C., Bouillet, P., Thomas, H.E., Borner, C., Silke, J., *et al.* (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460, 1035-1039.
- Kaiser, W.J., and Offermann, M.K. (2005). Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* 174, 4942-4952.
- Kakimi, K., Lane, T.E., Wieland, S., Asensio, V.C., Campbell, I.L., Chisari, F.V., and Guidotti, L.G. (2001). Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 194, 1755-1766.
- Karch, J., Kwong, J.Q., Burr, A.R., Sargent, M.A., Elrod, J.W., Peixoto, P.M., Martinez-Caballero, S., Osinska, H., Cheng, E.H., Robbins, J., *et al.* (2013). Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *Elife* 2, e00772.
- Karimian, G. (2012). Hepatocyte Apoptosis at the Interplay of Intracellular Organelles and Membrane-Bound Receptors: Targets for Therapy. *Clinical & Experimental Pharmacology* 02.
- Kashkar, H., Seeger, J.M., Hombach, A., Deggerich, A., Yazdanpanah, B., Utermohlen, O., Heimlich, G., Abken, H., and Kronke, M. (2006). XIAP targeting sensitizes Hodgkin lymphoma cells for cytolytic T-cell attack. *Blood* 108, 3434-3440.
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Vande Walle, L., Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., *et al.* (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479, 117-121.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kim, T.H., Zhao, Y., Barber, M.J., Kuharsky, D.K., and Yin, X.M. (2000). Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J Biol Chem* 275, 39474-39481.

## VI. Literaturverzeichnis

- Kim, W.H., Hong, F., Jaruga, B., Hu, Z., Fan, S., Liang, T.J., and Gao, B. (2001). Additive activation of hepatic NF-kappaB by ethanol and hepatitis B protein X (HBX) or HCV core protein: involvement of TNF-alpha receptor 1-independent and -dependent mechanisms. *FASEB J* 15, 2551-2553.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14, 5579-5588.
- Knolle, P.A., and Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 174, 21-34.
- Knolle, P.A., and Thimme, R. (2014). Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection. *Gastroenterology* 146, 1193-1207.
- Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Levy, S.E., Sligh, J.E., Cai, J., Jones, D.P., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 427, 461-465.
- Kondoh, M., Tsukada, M., Kuronaga, M., Higashimoto, M., Takiguchi, M., Himeno, S., Watanabe, Y., and Sato, M. (2004). Induction of hepatic metallothionein synthesis by endoplasmic reticulum stress in mice. *Toxicol Lett* 148, 133-139.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., and Wajant, H. (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21, 3964-3973.
- Krikos, A., Laherty, C.D., and Dixit, V.M. (1992). Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* 267, 17971-17976.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163.
- Kubicka, S., Kuhnel, F., Zender, L., Rudolph, K.L., Plumpe, J., Manns, M., and Trautwein, C. (1999). p53 Represses CAAT Enhancer-binding Protein (C/EBP)-dependent Transcription of the Albumin Gene: A MOLECULAR MECHANISM INVOLVED IN VIRAL LIVER INFECTION WITH IMPLICATIONS FOR HEPATOCARCINOGENESIS. *Journal of Biological Chemistry* 274, 32137-32144.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, 1013-1022.
- Lan, J.L., Chen, Y.M., Hsieh, T.Y., Chen, Y.H., Hsieh, C.W., Chen, D.Y., and Yang, S.S. (2011). Kinetics of viral loads and risk of hepatitis B virus reactivation in hepatitis B core antibody-positive rheumatoid arthritis patients undergoing anti-tumour necrosis factor alpha therapy. *Ann Rheum Dis* 70, 1719-1725.
- Lao, Y., and Chang, D.C. (2008). Mobilization of Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum to mitochondria plays a positive role in the early stage of UV- or TNFalpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 42-47.
- Legarda-Addison, D., Hase, H., O'Donnell, M.A., and Ting, A.T. (2009). NEMO/IKKgamma regulates an early NF-kappaB-independent cell-death checkpoint during TNF signaling. *Cell Death Differ* 16, 1279-1288.



- Lei, Y., Moore, C.B., Liesman, R.M., O'Connor, B.P., Bergstralh, D.T., Chen, Z.J., Pickles, R.J., and Ting, J.P. (2009). MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. *PLoS One* 4, e5466.
- Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Germann, P.G., Tiegs, G., and Wendel, A. (1994). Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J Immunol* 153, 1778-1788.
- Leung, A.W., Varanyuwatana, P., and Halestrap, A.P. (2008). The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem* 283, 26312-26323.
- Lewis, M., Tartaglia, L.A., Lee, A., Bennett, G.L., Rice, G.C., Wong, G.H., Chen, E.Y., and Goeddel, D.V. (1991). Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2830-2834.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., Jr., and Lemon, S.M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2992-2997.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Li, X., Yang, Y., and Ashwell, J.D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416, 345-347.
- Löffler, G. (2005). *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, Vol 6. Auflage (Springer).
- Loguercio, C., and Federico, A. (2003). Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 34, 1-10.
- Lowin, B., Beermann, F., Schmidt, A., and Tschopp, J. (1994a). A null mutation in the perforin gene impairs cytolytic T lymphocyte- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11571-11575.
- Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C., and Tschopp, J. (1994b). Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370, 650-652.
- Luftig, M.A. (2014). Viruses and the DNA Damage Response: Activation and Antagonism. *Annual Review of Virology* 1, 605-625.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Luthi, A.U., and Martin, S.J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 14, 641-650.

## VI. Literaturverzeichnis

- Malhi, H., and Kaufman, R.J. (2011). Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* *54*, 795-809.
- Marques, S.M., and Esteves da Silva, J.C. (2009). Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life* *61*, 6-17.
- Martinez-Caballero, S., Dejean, L.M., Jonas, E.A., and Kinnally, K.W. (2005). The role of the mitochondrial apoptosis induced channel MAC in cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr* *37*, 155-164.
- Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T., and Shimotohno, K. (1999). Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *Journal of virology* *73*, 4713-4720.
- McGuire, K.A., Barlan, A.U., Griffin, T.M., and Wiethoff, C.M. (2011). Adenovirus type 5 rupture of lysosomes leads to cathepsin B-dependent mitochondrial stress and production of reactive oxygen species. *Journal of virology* *85*, 10806-10813.
- McKenzie, M.D., Carrington, E.M., Kaufmann, T., Strasser, A., Huang, D.C., Kay, T.W., Allison, J., and Thomas, H.E. (2008). Proapoptotic BH3-only protein Bid is essential for death receptor-induced apoptosis of pancreatic beta-cells. *Diabetes* *57*, 1284-1292.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* *16*, 2794-2804.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* *437*, 1167-1172.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J. (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Molecular and cellular biology* *21*, 5299-5305.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell* *114*, 181-190.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* *11*, 577-590.
- Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* *80*, 293-299.
- Morgan, M.J., Kim, Y.S., and Liu, Z.G. (2008). TNFalpha and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res* *18*, 343-349.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* *264*, 1918-1921.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* *434*, 652-658.

- Natoli, G., Costanzo, A., Guido, F., Moretti, F., and Levrero, M. (1998). Apoptotic, non-apoptotic, and anti-apoptotic pathways of tumor necrosis factor signalling. *Biochem Pharmacol* 56, 915-920.
- Naude, P.J., den Boer, J.A., Luiten, P.G., and Eisel, U.L. (2011). Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J* 278, 888-898.
- Nichols, G.J., Schaack, J., and Ornelles, D.A. (2009). Widespread phosphorylation of histone H2AX by species C adenovirus infection requires viral DNA replication. *Journal of virology* 83, 5987-5998.
- Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.
- Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R.M., and Bernardi, P. (1996). Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem* 271, 2185-2192.
- Nophar, Y., Holtmann, H., Ber, R., and Wallach, D. (1988). Dominance of resistance to the cytotoxic effect of tumor necrosis factor in heterokaryons formed by fusion of resistant and sensitive cells. *J Immunol* 140, 3456-3460.
- O'Donnell, M.A., Legarda-Addison, D., Skountzos, P., Yeh, W.C., and Ting, A.T. (2007). Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling. *Curr Biol* 17, 418-424.
- O'Donnell, M.A., and Ting, A.T. (2010). Chronicles of a death foretold: dual sequential cell death checkpoints in TNF signaling. *Cell Cycle* 9, 1065-1071.
- O'Donnell, M.A., and Ting, A.T. (2011). RIP1 comes back to life as a cell death regulator in TNFR1 signaling. *FEBS J* 278, 877-887.
- Oakes, S.A., Opferman, J.T., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J., and Scorrano, L. (2003). Regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical Pharmacology* 66, 1335-1340.
- Obexer, P., and Ausserlechner, M.J. (2014). X-linked inhibitor of apoptosis protein - a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy. *Front Oncol* 4, 197.
- Okuda, M., Li, K., Beard, M.R., Showalter, L.A., Scholle, F., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2002). Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122, 366-375.
- Ong, S.B., Samangouei, P., Kalkhoran, S.B., and Hausenloy, D.J. (2015). The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 78, 23-34.
- Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11, 381-389.

## VI. Literaturverzeichnis

- Ozoren, N., Masumoto, J., Franchi, L., Kanneganti, T.D., Body-Malapel, M., Erturk, I., Jagirdar, R., Zhu, L., Inohara, N., Bertin, J., *et al.* (2006). Distinct roles of TLR2 and the adaptor ASC in IL-1 $\beta$ /IL-18 secretion in response to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 176, 4337-4342.
- Pan, J., Duan, L.X., Sun, B.S., and Feitelson, M.A. (2001). Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF- $\kappa$ B. *J Gen Virol* 82, 171-182.
- Pavlov, E.V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E.H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S.J., Mannella, C.A., and Kinnally, K.W. (2001). A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155, 725-731.
- Petersen, S.L., Wang, L., Yalcin-Chin, A., Li, L., Peyton, M., Minna, J., Harran, P., and Wang, X. (2007). Autocrine TNF $\alpha$  signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer cell* 12, 445-456.
- Petrasek, J., Iracheta-Vellve, A., Csak, T., Satishchandran, A., Kodys, K., Kurt-Jones, E.A., Fitzgerald, K.A., and Szabo, G. (2013). STING-IRF3 pathway links endoplasmic reticulum stress with hepatocyte apoptosis in early alcoholic liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16544-16549.
- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T.M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P.S., Kronke, M., and Mak, T.W. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73, 457-467.
- Protzer, U., Maini, M.K., and Knolle, P.A. (2012). Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol* 12, 201-213.
- Pu, Y., Luo, K.Q., and Chang, D.C. (2002). A Ca<sup>2+</sup> signal is found upstream of cytochrome c release during apoptosis in HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications* 299, 762-769.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., *et al.* (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337-1349.
- Quinsay, M.N., Lee, Y., Rikka, S., Sayen, M.R., Molkentin, J.D., Gottlieb, R.A., and Gustafsson, A.B. (2010). Bnip3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 48, 1146-1156.
- R&D. Recombinant Mouse BID Cytochrome c Release Assay. In [http://www.rndsystems.com/apoptotic\\_assay\\_detail\\_objectname\\_mouse\\_bid\\_cytochrome\\_caspx](http://www.rndsystems.com/apoptotic_assay_detail_objectname_mouse_bid_cytochrome_caspx).
- Rahmani, M., Peron, P., Weitzman, J., Bakiri, L., Lardeux, B., and Bernuau, D. (2001). Functional cooperation between JunD and NF- $\kappa$ B in rat hepatocytes. *Oncogene* 20, 5132-5142.
- Ramakrishnan, P., and Baltimore, D. (2011). Sam68 is required for both NF- $\kappa$ B activation and apoptosis signaling by the TNF receptor. *Mol Cell* 43, 167-179.

- Rauert, H., Wicovsky, A., Muller, N., Siegmund, D., Spindler, V., Waschke, J., Kneitz, C., and Wajant, H. (2010). Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *J Biol Chem* 285, 7394-7404.
- Redpath, C.J., Bou Khalil, M., Drozdal, G., Radisic, M., and McBride, H.M. (2013). Mitochondrial hyperfusion during oxidative stress is coupled to a dysregulation in calcium handling within a C2C12 cell model. *PLoS One* 8, e69165.
- Rehermann, B. (2013). Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med* 19, 859-868.
- Rittner, K., Schultz, H., Pavirani, A., and Mehtali, M. (1997). Conditional repression of the E2 transcription unit in E1-E3-deleted adenovirus vectors is correlated with a strong reduction in viral DNA replication and late gene expression in vitro. *Journal of virology* 71, 3307-3311.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., *et al.* (2009). Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta* 1787, 1342-1351.
- Rogers, G.W., Brand, M.D., Petrosyan, S., Ashok, D., Elorza, A.A., Ferrick, D.A., and Murphy, A.N. (2011). High throughput microplate respiratory measurements using minimal quantities of isolated mitochondria. *PLoS One* 6, e21746.
- Ryu, S.Y., Peixoto, P.M., Teijido, O., Dejean, L.M., and Kinnally, K.W. (2010). Role of mitochondrial ion channels in cell death. *Biofactors* 36, 255-263.
- Sasaki, H., Sheng, Y., Kotsuji, F., and Tsang, B.K. (2000). Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 60, 5659-5666.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-1687.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 32, 513-545.
- Schumann, J., Muhlen, K., Kiemer, A.K., Vollmar, A.M., and Tiegs, G. (2003). Parenchymal, but not leukocyte, TNF receptor 2 mediates T cell-dependent hepatitis in mice. *J Immunol* 170, 2129-2137.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2, 55-67.
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135-139.
- Scott, F.L., Denault, J.B., Riedl, S.J., Shin, H., Renatus, M., and Salvesen, G.S. (2005). XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J* 24, 645-655.

## VI. Literaturverzeichnis

- Seeger, J.M., Schmidt, P., Brinkmann, K., Hombach, A.A., Coutelle, O., Zigrino, P., Wagner-Stippich, D., Mauch, C., Abken, H., Kronke, M., *et al.* (2010). The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes melanoma cells toward adoptive CTL attack. *Cancer Res* 70, 1825-1834.
- Sermeus, A., Genin, M., Maincent, A., Fransolet, M., Notte, A., Leclere, L., Riquier, H., Arnould, T., and Michiels, C. (2012). Hypoxia-induced modulation of apoptosis and BCL-2 family proteins in different cancer cell types. *PLoS One* 7, e47519.
- Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., and Chen, Z.J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122, 669-682.
- Shenk, T., and Alwine, J.C. (2014). Human Cytomegalovirus: Coordinating Cellular Stress, Signaling, and Metabolic Pathways. *Annual Review of Virology* 1, 355-374.
- Shi, Y. (2004). Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* 117, 855-858.
- Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (2000). Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 577-582.
- Shiozaki, E.N., Chai, J., Rigotti, D.J., Riedl, S.J., Li, P., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Fairman, R., and Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 11, 519-527.
- Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghrayeb, J., Reimann, K.A., and Walker, C.M. (2003). Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 197, 1645-1655.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., *et al.* (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144, 281-292.
- Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2010). Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann N Y Acad Sci* 1201, 96-103.
- Stabenow, D., Frings, M., Truck, C., Gartner, K., Forster, I., Kurts, C., Tuting, T., Odenthal, M., Dienes, H.P., Cederbrant, K., *et al.* (2010). Bioluminescence imaging allows measuring CD8 T cell function in the liver. *Hepatology* 51, 1430-1437.
- Steckley, D., Karajgikar, M., Dale, L.B., Fuerth, B., Swan, P., Drummond-Main, C., Poulter, M.O., Ferguson, S.S., Strasser, A., and Cregan, S.P. (2007). Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 27, 12989-12999.
- Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J.A., Binder, B.R., and Lipp, J. (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med* 188, 211-216.

- Stennicke, H.R., Ryan, C.A., and Salvesen, G.S. (2002). Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci* 27, 94-101.
- Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. (1998). Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1387, 17-31.
- Stracker, T.H., Carson, C.T., and Weitzman, M.D. (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* 418, 348-352.
- Streetz, K., Leifeld, L., Grundmann, D., Ramakers, J., Eckert, K., Spengler, U., Brenner, D., Manns, M., and Trautwein, C. (2000). Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 119, 446-460.
- Su, F., and Schneider, R.J. (1997). Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8744-8749.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Szabo, I., and Zoratti, M. (1993). The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett* 330, 201-205.
- Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Koburai, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T.W., Yagita, H., Okumura, K., *et al.* (2001). Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* 276, 36530-36534.
- Tait, S.W., Oberst, A., Quarato, G., Milasta, S., Haller, M., Wang, R., Karvela, M., Ichim, G., Yatim, N., Albert, M.L., *et al.* (2013). Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis. *Cell Rep* 5, 878-885.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., and Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853.
- Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., and Lai, M.M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285, 107-110.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-241.
- Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., *et al.* (2011). The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell* 43, 432-448.
- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K.A., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2003). CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *Journal of virology* 77, 68-76.
- Thompson, M.R., Kaminski, J.J., Kurt-Jones, E.A., and Fitzgerald, K.A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 3, 920-940.

## VI. Literaturverzeichnis

- Tiegs, G., Wolter, M., and Wendel, A. (1989). Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem Pharmacol* 38, 627-631.
- Tilg, H., and Diehl, A.M. (2000). Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *The New England journal of medicine* 343, 1467-1476.
- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., *et al.* (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 28, 1589-1600.
- Twu, J.S., Lee, C.H., Lin, P.M., and Schloemer, R.H. (1988). Hepatitis B virus suppresses expression of human beta-interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 252-256.
- Valyi-Nagy, T., and Dermody, T.S. (2005). Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system. *Histol Histopathol* 20, 957-967.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., and Verma, I.M. (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274, 787-789.
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhout, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 135-147.
- Varfolomeev, E., Blankenship, J.W., Wayson, S.M., Fedorova, A.V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J.N., Elliott, L.O., Wallweber, H.J., *et al.* (2007). IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131, 669-681.
- Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Dynek, J.N., Zobel, K., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., and Vucic, D. (2008). c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 283, 24295-24299.
- Vaseva, A.V., and Moll, U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta* 1787, 414-420.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., *et al.* (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277, 445-454.
- Vince, J.E., Pantaki, D., Feltham, R., Mace, P.D., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Davidson, A.J., Callus, B.A., Wong, W.W., Gentle, I.E., *et al.* (2009). TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (tnf) to efficiently activate nf- $\kappa$ B and to prevent tnf-induced apoptosis. *J Biol Chem* 284, 35906-35915.
- Volpes, R., van den Oord, J.J., De Vos, R., and Desmet, V.J. (1992). Hepatic expression of type A and type B receptors for tumor necrosis factor. *J Hepatol* 14, 361-369.



- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65.
- Wajant, H., and Scheurich, P. (2011). TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway. *FEBS J* 278, 862-876.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., and Baldwin, A.S., Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683.
- Wang, L., Du, F., and Wang, X. (2008). TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133, 693-703.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & development* 14, 2060-2071.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.
- Weinlich, R., and Green, D.R. (2014). The two faces of receptor interacting protein kinase-1. *Molecular cell* 56, 469-480.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-859.
- Wilson, N.S., Dixit, V., and Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* 10, 348-355.
- Wohlleber, D., Kashkar, H., Gartner, K., Frings, M.K., Odenthal, M., Hegenbarth, S., Borner, C., Arnold, B., Hammerling, G., Nieswandt, B., *et al.* (2012). TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation. *Cell Rep* 2, 478-487.
- Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., *et al.* (2014). Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer cell* 26, 549-564.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139, 1281-1292.
- Wu, J., and Chen, Z.J. (2014). Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol* 32, 461-488.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., *et al.* (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.
- Yang, Q.H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M.L., and Du, C. (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes & development* 17, 1487-1496.

## VI. Literaturverzeichnis

- Yang, S., Thor, A.D., Edgerton, S., and Yang, X. (2006). Caspase-3 mediated feedback activation of apical caspases in doxorubicin and TNF-alpha induced apoptosis. *Apoptosis* 11, 1987-1997.
- Yang, Y., Jiang, G., Zhang, P., and Fan, J. (2015). Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil Med Res* 2, 12.
- Yi, A.K., Yoon, H., Park, J.E., Kim, B.S., Kim, H.J., and Martinez-Hernandez, A. (2006). CpG DNA-mediated induction of acute liver injury in D-galactosamine-sensitized mice: the mitochondrial apoptotic pathway-dependent death of hepatocytes. *J Biol Chem* 281, 15001-15012.
- Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886-891.
- Yoon, J.H., and Gores, G.J. (2002). Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol* 37, 400-410.
- Youle, R.J. (2007). Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement. *Science* 315, 776-777.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
- Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337, 1062-1065.
- Zhang, D.F., Ren, H., Jia, X.P., and Zhou, Y.S. (1993). Serum tumor necrosis factor (TNF) in the pathogenesis of clinical hepatic failure of HCV and/or HBV infection. *Chinese medical journal* 106, 335-338.
- Zhang, L., and Wang, A. (2012). Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. *Front Plant Sci* 3, 293.
- Zhao, Y., Ding, W.X., Qian, T., Watkins, S., Lemasters, J.J., and Yin, X.M. (2003). Bid activates multiple mitochondrial apoptotic mechanisms in primary hepatocytes after death receptor engagement. *Gastroenterology* 125, 854-867.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2007). Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *Journal of virology* 81, 3170-3180.
- Zhu, N., Khoshnan, A., Schneider, R., Matsumoto, M., Dennert, G., Ware, C., and Lai, M.M. (1998). Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *Journal of virology* 72, 3691-3697.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.

## VII. Abbildungsverzeichnis

Abbildung I: Schematische Darstellung der Apoptose-Signalwege.....	9
Abbildung II: TNFR1-Signaltransduktion. ....	22
Abbildung III: Experimentelles Design der TNF-vermittelten viralen Hepatitis.....	42
Abbildung 1: Eine Virale Infektion sensibilisiert für TNF-vermittelte Leberschädigung.....	59
Abbildung 2: Induktion einer TNF-vermittelten Hepatitis nach Infektion mit unterschiedlichen Viren.....	61
Abbildung 3: Analyse der Beteiligung der TNF-Rezeptoren (TNFR) am TNF- vermittelten Zelltod infizierter Hepatozyten. ....	62
Abbildung 4: Untersuchung des Apoptose-Signalweges in der TNF- vermittelten viralen Hepatitis.....	64
Abbildung 5: Untersuchung der TNF-induzierten NFκB-Aktivierung nach viraler Infektion. ....	66
Abbildung 6: Betrachtung der TNFR1-Signaltransduktion im Zeitverlauf.....	68
Abbildung 7: Kombinierte Analyse der TNF-abhängigen Caspase- und NFκB- Aktivierung auf Einzelzelebene.....	69
Abbildung 8: Expression antiapoptotischer Schlüsselproteine nach viraler Infektion. ....	71
Abbildung 9: Einfluss einer Manipulation der XIAP-Expression auf die TNF- induzierte Caspasen-Aktivierung. ....	73
Abbildung 10: Untersuchung der Rolle von PRR in der TNF-vermittelten viralen Hepatitis.....	75
Abbildung 11: Induktion zellulären Stresses durch eine virale Infektion. ....	77
Abbildung 12: Beeinflussung von Proteinen der Bcl-2-Familie durch virale Infektion. ....	80
Abbildung 13: Auswirkungen der viralen Infektion von Hepatozyten auf die mitochondriale Morphologie.....	81
Abbildung 14: Respirometrische Analyse isolierter Mitochondrien. ....	84

## VII. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 15: Untersuchung der Rolle mitochondrialer ROS in der TNF-vermittelten viralen Hepatitis durch das Antioxidans MitoQ. ....	86
Abbildung 16: Einfluss viraler Infektion auf die apoptotischen Funktionen der Mitochondrien. ....	88
Abbildung 17: Die Rolle von Steady State-TNFR-Signalen für die mitochondrialen Veränderungen durch Infektion. ....	91
Abbildung 18: Intervention mit Ca <sup>2+</sup> -Signalen und mPT hat Auswirkungen auf die Leberschädigung. ....	92
Abbildung IV: Schematische Darstellung eines Modells zum Mechanismus der TNF-vermittelten Apoptose virusinfizierter Hepatozyten. ....	112

## VIII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Acrylamidgele .....	49
Tabelle 2: Reaktionsansätze für $\text{Ca}^{2+}$ -/Bid-induzierte Permeabilitäts- Transition.....	55
Tabelle 3: Protokoll der Messung im Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer .....	56

## IX. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACD	akzidenteller Zelltod (engl.: accidental cell death)
Ad	Adenovirus
AdGOL	Adenovirus codierend für eGFP, Ovalbumin und Luziferase
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	engl.: apoptosis inducing factor
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANT	engl.: adenine nucleotide translocator
AP-1	engl.: activator protein 1
APAF-1	engl.: apoptotic peptidase activating factor 1
APC	Antigen präsentierende Zelle (engl.: antigen presenting cell)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATF2	engl.: activating transcription factor 2
ATM	engl.: ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	engl.: Bcl-2 antagonist/killer-1
Bax	engl.: Bcl-2-associated X protein
Bcl	engl.: B-cell lymphoma
Bid	engl.: BH3 interacting domain death agonist
Bim	engl.: Bcl-2-interacting mediator of cell death
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
Caspase	engl.: cysteinyl aspartic acid protease
cDNA	komplementäre DNA
cFLIP	engl.: cellular FLICE-like inhibitory protein
CHOP	engl.: CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein
cIAP	engl.: cellular inhibitor of apoptosis protein

CsA	Cyclosporin A
CTL	zytotoxische T Zelle (engl.: cytotoxic T cell)
Cyt C	Cytochrom C
Da	Dalton, atomare Masseneinheit
DD	Todesdomäne (engl.: death domain)
DDR	DNA-Schadensantwort (engl.: DNA damage response)
Decyl-TPP	Decyl-Triphenylphosphonium
DED	engl.: death effector domain
DISC	engl.: death-inducing signaling complex
DKO	Doppel-KO
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
eIF2 $\alpha$	engl.: eukaryotic translation initiation factor 2A
ELISA	engl.: enzyme-linked immunosorbent assay
EM	elektronenmikroskopisch/Elektronenmikroskopie
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	engl.: extracellular regulated MAP kinase
ERK	engl.: extracellular regulated kinase
et al.	und andere (lat.: et alii)
FADD	engl.: Fas associated DD
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleoid
FasL	Fas Ligand
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon
FCS	fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
gapdh	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GRP78	engl.: glucose-regulated protein, 78kDa
h	Stunde (lat. hora)
H2AX ( $\gamma$ -)	engl.: H2A histone family, member X (phosphorylated)

## IX. Abkürzungsverzeichnis

H2B	Histon H2B
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hypotonischer Extraktions- bzw. Hämatoxilin-Eosin
HEK	engl.: human embryonic kidney
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
Hsp 60	engl.: heat shock protein 60
hTNF	humanes TNF
HtrA2	engl.: high temperature requirement protein A2
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
IAP	inhibitor of apoptosis protein
IFN	Interferon
IFNAR	IFN $\alpha$ -Rezeptor
I $\kappa$ B $\alpha$	NF $\kappa$ B-Inhibitor $\alpha$ (engl.: inhibitor of $\kappa$ B $\alpha$ )
IKK	engl.: inhibtor of $\kappa$ B kinase
IL	Interleukin
IMM	innere Mitochondrienmembran
IMS	Intermembranraum (engl.: intermembrane space)
IP	Isolations-Puffer
JNK	engl.: c-Jun N-terminal kinase
JNK	engl.: c-Jun N-terminal kinase
k	kilo-
KO	knock out
l	Liter
LAMP 2	engl.: lysosomal-associated membrane protein 2
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LSEC	sinusoidalen Endothelzelle der Leber (engl.: liver sinusoidal endothelial cell)
LT $\beta$ R	Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor
LUBAC	engl.:linear ubiquitin chain assembly complex
M	Molar
m	milli- bzw. Meter



MAC	mitochondrialer Apoptose-induzierter Kanal (engl.: mitochondrial apoptosis-induced channel)
MAM	Mitochondrien-assoziierte ER-Membranen
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MAVS	engl.: mitochondrial antiviral signaling
Mcl-1	engl.: myeloid cell leukemia 1
MDA5	engl.: melanoma differentiation antigen 5
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
min	Minute
MLKL	engl.: mixed lineage kinase domain-like
MOMP	engl.: mitochondrial outer membrane permeabilization
mPT	engl.: mitochondrial permeability transition
mPTP	engl.: mitochondrial permeability transition pore
mRNA	engl.: messenger RNA
mTNF	membrangebundenes TNF bzw. murines TNF
MyD88	engl.: myeloid differentiation primary response 88
n	Gruppengröße bzw. nano-
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFκB	engl.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NIK	engl.: NFκB-inducing kinase
NK	engl.: natural killer
NLRP3	engl.: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NP40	Nonident P-40
Nr.	Nummer
ns	nicht signifikant
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate (engl.: oxygen consumption rate)
OMM	äußere Mitochondrienmembran (engl.: outer mitochondrial membrane)
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
p i.	nach Infektion (lat.: post infectionem)
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Struktur (engl.: pathogen associated molecular pattern)

## IX. Abkürzungsverzeichnis

PARP	engl.: poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PERK	engl.: protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase
PFA	Paraformaldehyd
PFU	engl.: plaque forming unit
pH	lat.: potentia Hydrogenii
PMP70	engl.: 70 kDa peroxisomal membrane protein
PRR	Struktur-Erkennungsrezeptor (engl.: pattern recognition receptor)
qRT-PCR	quantitativer reverse Transkriptase-PCR
rBid	rekombinantes, Caspase 8-gespaltenes Bid
RCD	regulierter Zelltod (engl.: regulated cell death)
RCR	respiratorischer Kontroll-Quotient (engl.: respiratory control ratio)
Rh123	Rhodamin 123
RIG-I	engl.: retinoic acid inducible gene I
RIPA	Radioimmunoprecipitations-Assay
RIPK1	engl.: receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
RLR	RIG-I-like Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNS	reaktive Stickstoffspezies (engl.: reactive nitrogen species)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (engl.: standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (engl.: standard error of mean)
SMAC	engl.: second mitochondrial activator of caspases
STING	engl. stimulator of interferon genes
sTNF	lösliches TNF (engl.: soluble TNF)
sXBP1	gespleißtes XBP1
T X-100	Triton X-100
tBid	gespaltenes Bid (engl.: truncated Bid)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (engl.: Tris buffered saline with Tween)

TCR	T Zell-Rezeptor (engl.: T cell receptor)
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TL1A	engl.: TNF-like ligand 1A
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	engl.: TNFR associated DD
TRAF2	engl.: TNF recetor-associated factor 2
TRAIL	engl.: TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRIF	engl.: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
TWEAK	engl.: TNF-like weak inducer of apoptosis
U	Unit, internationale Einheit der Enzymaktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VDAC	engl.: voltage-dependent anion channel
XBP1	engl.: X-box binding protein 1
XIAP	engl.: X-linked inhibitor of apoptosis protein
$\alpha$	anti-
$\mu$	mikro-

## X. Vorveröffentlichungen

### **Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteil folgender Kongressbeiträge:**

Janas MK, Kashkar H, Heikenwälder M, Knolle PA, Wohlleber D.

Mitochondria play a central role in a novel innate immune sensing mechanism of viral infection in hepatocytes.

Vortrag auf dem *International Liver Congress™ 2014 - 49th Annual meeting of the European Association for the Study of the Liver*, 2014, London, England

Frings MK, Kashkar H, Heikenwälder M, Krönke M, Knolle PA, Wohlleber D.

Mitochondria play a central role in a novel innate immune sensing mechanism of viral infection.

Vortrag auf dem *43rd Annual Meeting of German Society for Immunology (DGfI)*, 2013, Mainz, Deutschland

Frings MK, Kashkar H, Heikenwälder M, Wohlleber D, Krönke M, Knolle PA.

Viral infection of hepatocytes sets the course for apoptosis induction in response to TNF.

Vortrag auf der *14th International TNF Conference*, 2013, Quebec City, Kanada

Frings MK, Kashkar H, Krönke M, Heikenwälder M, Wohlleber D, Knolle PA.

Viral infection sensitizes hepatocytes towards TNF-induced apoptosis.

Vortrag auf dem *European Congress of Immunology*, 2012, Glasgow, Schottland

Janas MK, Kashkar H, Heikenwälder M, Knolle PA, Wohlleber D.

Mitochondrial vulnerability is a key determinant of a novel innate immune sensing mechanism of viral infection of hepatocytes.

Poster auf dem *44rd Annual Meeting of German Society for Immunology (DGfI)*, 2014, Bonn, Deutschland

Frings MK, Kashkar H, Krönke M, Wohlleber D, Knolle PA.

Viral infection increases mitochondrial vulnerability and enhances TNF-induced apoptosis in hepatocytes.

Poster auf dem *29th Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver GASL*, 2013, Hannover, Deutschland